

Die Rolle von Plasminogen bei der Immunevasion der Gram-negativen Bakterien

Haemophilus influenzae* und *Borrelia burgdorferi

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat)



**vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Diplom-Biologin Diana Barthel
geboren am 26 September 1983 in Leipzig

Gutachter

Prof. Dr. Peter F. Zipfel

Hans-Knöll-Institut Jena

Abteilung Infektionsbiologie

Beutenbergstr. 11a

07745 Jena

Prof. Dr. Bernhard Hube

Hans-Knöll-Institut Jena

Abteilung Mikrobielle Pathogenitätsmechanismen

Beutenbergstr. 11a

07745 Jena

Dr. Tobias Ölschläger

Institut für Molekulare Infektionsbiologie

Abteilung Pathogenic Enterobacteria

Josef-Schneider-Str. 2

97080 Würzburg

Tag der Disputation: 23. Februar 2012

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	- 1 -
Tabellenverzeichnis	- 2 -
Abkürzungsverzeichnis	- 3 -
1. Einleitung	- 5 -
1.1. Enzymkaskaden dienen als Angriffspunkt für pathogene Mikroorganismen	- 5 -
1.1.1. Das Blutgerinnungssystem und die Fibrinolyse	- 5 -
1.1.2. Das menschliche Plasmaprotein Plasminogen	- 7 -
1.1.3. Die Plasminogenaktivatoren	- 10 -
1.1.3.1. Die menschlichen Plasminogenaktivatoren	- 10 -
1.1.3.2. Die bakteriellen Plasminogenaktivatoren	- 10 -
1.1.4. Die Plasminogenregulatoren	- 11 -
1.1.5. Plasminogen bringt pathogene Mikroorganismen mit dem menschlichen Fibrinolyse-System in Kontakt	- 12 -
1.2. Das menschliche Immunsystem	- 17 -
1.2.1. Die natürlichen Barrieren des Menschen	- 17 -
1.2.2. Das angeborene Immunsystem	- 18 -
1.2.2.1. Das Komplementsystem	- 18 -
1.2.2.2. Die Regulatoren des Komplementsystems	- 22 -
1.2.2.3. Die Zellen des angeborenen Immunsystems	- 24 -
1.2.2.4. Die Phagozytose und die Zytokine	- 25 -
1.2.3. Das erworbene (adaptive) Immunsystem	- 26 -
1.2.3.1. Die T-Lymphozyten	- 26 -
1.2.3.2. Die B-Lymphozyten	- 27 -
1.2.4. Das Zusammenspiel zwischen Komplement- und Blutgerinnungssystem	- 28 -
1.3. Die Immunevasion von pathogenen Mikroorganismen	- 30 -
1.3.1. <i>Haemophilus influenzae</i>	- 30 -
1.3.1.1. Die Taxonomie	- 30 -

1.3.1.2.	Die Pathogenese von <i>H. influenzae</i>	- 31 -
1.3.1.3.	Die Pathogenitätsfaktoren von <i>H. influenzae</i>	- 32 -
1.3.1.4.	Die Vakzine gegen <i>H. influenzae</i>	- 35 -
1.3.1.5.	Die Antibiotikaresistenzen von <i>H. influenzae</i>	- 36 -
1.3.1.6.	Das Adhäsionsprotein Protein E (PE)	- 37 -
1.3.2.	<i>Borrelia burgdorferi</i>	- 38 -
1.3.2.1.	Die Taxonomie.....	- 38 -
1.3.2.2.	Die Pathogenese von <i>B. burgdorferi</i>	- 39 -
1.3.2.3.	Die Pathogenitätsfaktoren von <i>B. burgdorferi</i>	- 40 -
1.3.2.4.	Vakzine und Antibiotikaresistenzen von <i>B. burgdorferi</i>	- 41 -
1.3.2.5.	Die CRASP-Proteine von <i>B. burgdorferi</i>	- 42 -
2.	Ziel der Arbeit.....	- 45 -
3.	Überblick der publizierten und eingereichten Manuskripte	- 46 -
3.1.	Manuskript 1 <i>Haemophilus influenzae</i> uses the PE Surface Protein to Acquire Human Plasminogen and to Evade Innate Immunity.	- 46 -
3.2.	Manuskript 3: <i>Borrelia burgdorferi</i> Infection-Associated Surface Proteins ErpP, ErpA, and ErpC Bind Human Plasminogen.....	- 48 -
3.3.	Manuskript 3: Plasminogen is a Potent Complement Inhibitor.	- 50 -
4.	Manuskripte.....	- 52 -
4.1.	Manuskript 1: <i>Haemophilus influenzae</i> uses the PE Surface Protein to Acquire Human Plasminogen and to Evade Innate Immunity.	- 52 -
4.2.	Manuskript 2: <i>Borrelia burgdorferi</i> Infection-Associated Surface Proteins ErpP, ErpA and ErpC Bind Human Plasminogen.....	- 59 -
4.3.	Manuskript 3: Plasminogen is a Potent Complement Inhibitor	- 66 -
5.	Diskussion	- 94 -
5.1.	Charakterisierung von Plasminogen als Komplementregulator	- 94 -
5.2.	Gram-negative Bakterien nutzen Plasminogen zur Immunevasion	- 99 -
6.	Zusammenfassung	- 105 -
7.	Summary	- 107 -
8.	Literatur	- 109 -

9.	Eigenständigkeitserklärung.....	- 122 -
10.	Lebenslauf.....	- 123 -
11.	Übersicht von Vorträgen, Poster, Veröffentlichungen und Stipendien	- 125 -
11.1.	Vorträge	- 125 -
11.2.	Poster	- 125 -
11.3.	Veröffentlichungen.....	- 126 -
11.4.	Stipendien	- 126 -
12.	Danksagung und Widmung	- 128 -

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Im gesunden menschlichen Organismus besteht ein Gleichgewicht zwischen der Blutgerinnung und der Fibrinolyse.	- 7 -
Abbildung 2: Die Struktur des Plasminogens.	- 9 -
Abbildung 3: Das Plasminogensystem liegt unter strenger Kontrolle.	- 12 -
Abbildung 4: Der Ablauf des Komplementsystems.	- 21 -
Abbildung 5: Die Faktor H-Familie.	- 23 -
Abbildung 6: Die Struktur des Komplementregulators C4BP.	- 24 -
Abbildung 7: Die Aktivierung des Komplementsystems kann über einen vierten Weg erfolgen.	- 29 -
Abbildung 8: Rasterelektronisch-mikroskopische Aufnahme von <i>H. influenzae</i>	- 31 -
Abbildung 9: Die Infektion von <i>H. influenzae</i> verläuft in vier klassischen Phasen.	- 34 -
Abbildung 10: Das Adhäsionsprotein PE von <i>H. influenzae</i>	- 38 -
Abbildung 11: Rasterelektron-mikroskopische Aufnahme von Spirochäten der Borrelien-Art <i>B. burgdorferi</i>	- 39 -
Abbildung 12: Die Infektion von <i>B. burgdorferi</i> verläuft in vier Phasen.	- 41 -
Abbildung 13: Das multifunktionale Protein BbCRASP-3 (ErpP) von <i>B. burgdorferi</i>	- 44 -
Abbildung 14: Plasminogen bindet an das Komplementprotein C3b.	- 95 -
Abbildung 15: Die Serinproteasen Plasmin und Faktor I spalten C3b an unterschiedlichen Stellen.	- 96 -
Abbildung 16: Die Serinprotease Plasmin und die C5-Konvertase spalten C5 an unterschiedlichen Stellen.	- 97 -
Abbildung 17: Die Rolle von Plasmin(ogen) im Komplementsystem.	- 98 -
Abbildung 18: Die Rolle von Plasminogen bei der Immunevasion und Gewebsinvasion.	- 103 -

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Prokaryontische Plasminogen-Bindeproteine und Aktivatoren.	- 15 -
Tabelle 2:	Plasminogen-Bindeproteine von pathogenen Hefen.	- 16 -
Tabelle 3:	Bindeeigenschaften der CRASP-Proteine verschiedener <i>Borrelia</i> - Arten.	- 43 -
Tabelle 4:	Bakterielle Proteine binden mehrere verschiedene Plasmaproteine zur Immunevasion.	- 104 -

Abkürzungsverzeichnis

APZ	Antigenpräsentierende Zelle
BZR	B-Zell-Rezeptor
C	Komplementprotein (engl. „ <i>complement</i> “)
CD	engl. „ <i>cluster of differentiation</i> “
CFHR	Faktor H-verwandtes Protein-1 (engl. „ <i>complement factor H-related protein</i> “)
CRASP	engl. „ <i>complement regulator-acquiring surface protein</i> “
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Cys	Cystein
C4BP	C4-bindendes Protein
EZM	Extrazelluläre Matrix
εACA	epsilon-Aminocarbonsäure
FHL-1	Faktor H-ähnliches Protein-1 (engl. „ <i>factor H-like protein-1</i> “)
Glu	Glutamin
Hib	<i>H. influenzae</i> Serotyp b
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharid
LOS	Lipooligosaccharid
Lys	Lysin
K	Kringel
kDa	Kilodalton
MHC	Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex (eng. „ <i>major histocompatibility complex</i> “)
N-Terminus	Amino-(NH ₂)-Terminus
NTHi	Nicht-typisierbarer <i>H. influenzae</i> Stamm
PAI	Plasminogenaktivator-Inhibitor
PE	Protein E
PRP	Polyribose-Ribitol-Phosphat
SAK	Staphylokinase
SCR	kurze identische wiederholende Einheiten (engl. „ <i>short consensus repeats</i> “)
SK	Streptokinase
TCC	Terminaler Komplementkomplex (engl. „ <i>terminal complement complex</i> “)
TLR	Toll-like Rezeptor

tPa	Gewebsähnliche (engl. „ <i>tissue-like</i> “)-Plasminogenaktivator
TZR	T-Zell-Rezeptor
uPa	Urokinase (engl. „ <i>urokinase-type</i> “)-Plasminogenaktivator
Val	Valin

1. Einleitung

Seit den letzten Jahrzehnten treten immer häufiger invasive bakterielle Erkrankungen auf, die zu einem klinischen Problem führen. Das Aufkommen und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen bei der Behandlung dieser Krankheiten sind Gegenstand aktueller Forschungsarbeiten und stellt die Notwendigkeit, die Interaktion zwischen Mikroorganismen und Wirt zu verstehen, in den Vordergrund. In dieser Arbeit wird eine Strategie von Mikroorganismen untersucht, Proteine aus dem menschlichen Serum zu ihren Vorteil einzusetzen und zur Immunevasion zu nutzen.

1.1. Enzymkaskaden dienen als Angriffspunkt für pathogene Mikroorganismen

Im menschlichen Serum laufen viele Prozesse ab, die die Körperfunktion aufrechterhalten und eine Infektion durch Mikroorganismen effektiv abwehren. Viele dieser Prozesse, wie das Blutgerinnungssystem, die Fibrinolyse, das Kininsystem und das Komplementsystem finden über so genannte Enzymkaskaden statt. Vorgestellte, inaktive Enzyme (Zymogene) konvertieren durch proteolytische Spaltung in ihre aktive Form, die wiederum nachgestellte Zymogene aktivieren. Viele Mikroorganismen haben sich diese Prozesse zu Nutze gemacht um eine Infektion hervorzurufen. Mikroorganismen, die in bestimmte Regionen des Körpers eindringen, dort eine lokale Infektion auslösen und eine Schädigung des Gewebes verursachen, nennt man pathogene Mikroorganismen. Eine Infektion ist definiert durch Ansiedlung, Wachstum und Vermehrung von pathogenen Mikroorganismen in dem menschlichen Organismus.

Diese Arbeit untersucht das Zusammenspiel von pathogenen Mikroorganismen mit zwei wichtigen Enzymkaskaden, der Fibrinolyse, die Gegenreaktion des Gerinnungssystems und dem Komplementsystem. Bei einer Verletzung bzw. einer Infektion werden das Gerinnungs- und das Komplementsystem umgehend aktiviert. Diese Prozesse sind sehr genau durch Substrat, Aktivatoren, Inhibitoren, Kofaktoren und Rezeptoren reguliert, die als Angriffsorte den pathogenen Mikroorganismen zur Verfügung stehen.

1.1.1. Das Blutgerinnungssystem und die Fibrinolyse

Das Blutgerinnungssystem ist für den menschlichen Organismus lebensnotwendig. Es hat die Hauptfunktion, nach Verletzungen die Blutungen zu stoppen, zerstörtes Gewebe zu reparieren, und somit den Schutz des menschlichen Organismus vor einer Infektion aufrechtzuerhalten. Das Blutgerinnungssystem ist ein genau kontrolliertes

Zusammenspiel dreier Komponenten: der Gefäßwand (Endothel), zirkulierender Blutplättchen (Thrombozyten) und mehrerer Plasmaproteine. Dieses hoch spezifische System wird auf zwei verschiedenen Wegen aktiviert: (1) dem intrinsischen Weg, durch Kontakt des Blutes mit körperfremden Oberflächen oder (2) dem extrinsischen Weg, durch den Kontakt des Blutes mit gerinnungsaktivierenden Substanzen aus dem Körpergewebe, wie dem Gewebefaktor („*tissue factor*“). Ist der Gerinnungsprozess über einen oder über beide Wege aktiviert, verläuft der Prozess über spezifische Blutgerinnungsfaktoren. Diese Gerinnungsfaktoren gehören zu einer Familie von über 50 Komponenten, wovon die Mehrzahl Serinproteasen sind. Die Aktivierung beider Wege vermittelt jeweils über eine Enzymkaskade die Bildung von Prothrombin zu Thrombin. Thrombin spaltet das lösliche Fibrinogen zu Fibrin, das zusammen mit den Blutplättchen ein Fibringerinnsel (Thrombus) bildet, das die Blutung stoppt.

Der Prozess des Blutgerinnungssystems steht im Gleichgewicht von gerinnungsaktivierender und gerinnungshemmender Faktoren. Bei Auftreten von Verletzungen ist es essentiell, dass die Bildung eines Thrombus schnell eintritt. Eine überschießende Gerinnungsreaktion führt zur Ausbildung einer Thrombose, d.h. überschüssige Thromben rufen eine Verstopfung der Blutgefäße hervor. Aus diesem Grund wird das Blutgerinnungssystem streng reguliert. Neben den negativen Plasmaregulatoren, wie den „*tissue factor pathway inhibitor*“ (TFPI), das Antithrombin (AT) und dem aktivierten Protein C (APC), die die Gerinnungsfaktoren inhibieren, reguliert der Prozess der Fibrinolyse die Blutgerinnung und ist somit die Gegenreaktion des Blutgerinnungssystems [1].

Plasmin, das aus dem Zymogen Plasminogen aktiviert wird, ist das Hauptenzym der Fibrinolyse. Plasmin spaltet zunächst das Fibringerinnsel in die lösliche Form, dem Fibrinogen und dieses weiter in Fibrinogenabbauprodukte. Somit werden nicht benötigte Thromben abgebaut und die Bildung einer Thrombose verhindert. Auch hier führt ein krankhaftes Überwiegen der Thrombus-Auflösung zur Hyperfibrinolyse. Das Gleichgewicht zwischen Blutgerinnung und Fibrinolyse ist für die pathologische Bedeutung des Blutes und der Thrombose essentiell (**Abbildung 1**). Eine Störung dieses Gleichgewichtes, führt zur Ausbildung der Krankheiten Thrombose und Hyperfibrinolyse.

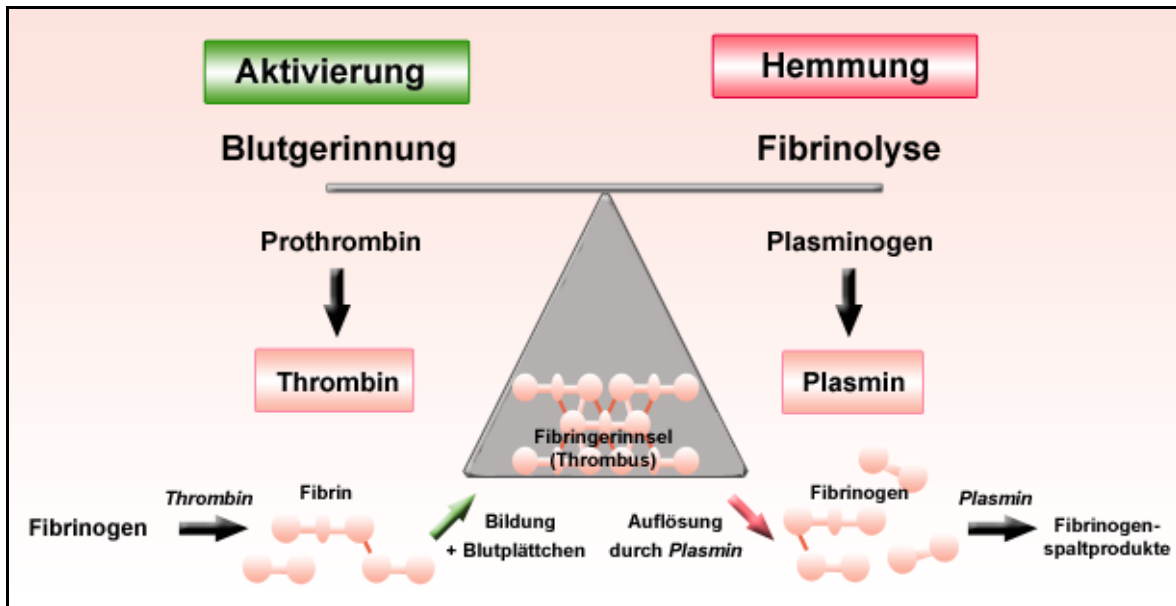


Abbildung 1: Im gesunden menschlichen Organismus besteht ein Gleichgewicht zwischen der Blutgerinnung und der Fibrinolyse.

Die Prozesse der Blutgerinnung und der Fibrinolyse laufen über Enzymkaskaden ab, die die Zymogene Prothrombin und Plasminogen in ihre aktive Form, Thrombin und Plasmin, konvertieren. Thrombin und Plasmin sind die jeweiligen Schlüsselenzyme und bilden bzw. lösen Fibrinvernetzungen auf. Fibrinogen wird durch Thrombin zu Fibrin gespalten, das zusammen mit Blutplättchen ein Fibringerinnsel (Thrombus) bildet. Plasmin spaltet das Fibringerinnsel zu dem löslichen Bestandteil Fibrinogen und dieses weiter zu Fibrinogenabbauprodukten.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich hauptsächlich mit dem Plasmaprotein Plasminogen. In den folgenden Abschnitten wird dieses Protein genauer vorgestellt und die Bedeutung des Plasminogens für den menschlichen Organismus sowie für pathogene Mikroorganismen beschrieben.

1.1.2. Das menschliche Plasmaprotein Plasminogen

Das Plasmaprotein Plasminogen zirkuliert im menschlichen Serum in einer Konzentration von 200 µg/ml und besitzt eine Halbwertszeit von zwei Tagen [2]. Das Protein wird in der Leber synthetisiert und gelangt von dort in den Blutkreislauf [3]. Plasminogen ist ein 92 Kilodalton (kDa) großes, einzelkettiges Glykoprotein, das aus 810 Aminosäuren besteht. Am N-Terminus des Plasminogens befindet sich ein Signalpeptid, das nach der Prozessierung des Proteins abgespalten wird. Im menschlichen Serum sind zwei verschiedene Formen von Plasminogen zu finden. Das Glutamat-Plasminogen besitzt ein 77 Aminosäuren großes Voraktivierungspeptid, beginnend mit der Aminosäure Glutamat (Glu). Nach der autokatalytischen Abspaltung des Voraktivierungspeptides durch Plasmin, wird das Lysin-Plasminogen generiert, beginnend mit der Aminosäure Lysin (Lys) [4]. Das voraktivierte Lys-Plasminogen ist effizienter zu aktivieren als das Glu-Plasminogen und

besitzt eine höhere Affinität zu Fibrin(ogen) [4]. Das Glu- sowie das Lys-Plasminogen bestehen aus fünf „Kringel“-Domänen (K1-K5) und aus einer C-terminalen Protease-Domäne (**Abbildung 2A**). Die Kringeldomänen sind untereinander homolog und ihre Tertiärstruktur umfasst jeweils ca. 80 Aminosäuren. Jede Kringeldomäne besitzt sechs Cystein-Reste (Cys), die drei Disulfidbrücken nach einem typischen Muster (Cys1-6, Cys2-4, Cys3-5) ausbilden und somit für die Struktur jeder einzelnen Kringeldomäne verantwortlich sind [5]. Kringeldomänen sind in weiteren Serumproteinen zu finden, von denen mehrere als Fibrinolysefaktoren identifiziert wurden [6]. Die Kringeldomänen K1, K4 und K5 besitzen Lysinbindestellen und vermitteln die Bindung von Inhibitoren, Zellen und weiteren Liganden über C-terminale oder intern gelegene Lysinreste des Liganden [7, 8]. Die Lysinbindestellen spielen eine wichtige Rolle bei der Bindung von Plasminogen an Fibrin(ogen), sowie bei der Interaktion von Plasminogen mit α_2 -Antiplasmin, einem Plasminregulator. Plasminogen bindet Fibrin(ogen) über die Kringeldomänen K1-3 und K5 [9].

Plasminogen ist ein Zymogen, d.h. es liegt in seiner proteolytisch inaktiven Form vor und wird durch spezifische Aktivatoren zur aktiven Serinprotease umgewandelt (Abschnitt 1.1.3.). Die Plasminogenaktivatoren spalten Plasminogen proteolytisch an einer einzelnen Stelle zwischen den Aminosäuren Arginin₅₆₁ und Valin₅₆₂ (Arg₅₆₁-Val₅₆₂). Das entstehende zweikettige Protein Plasmin ist durch zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden [10]. Plasmin ist eine Serinprotease, gekennzeichnet durch die katalytischen Aminosäuren Histidin, Aspartat und Serin.

Plasmin ist verantwortlich für die Auflösung von Fibringerinnsele und ist somit ein Gegenspieler der Blutgerinnung [11]. Neben der Auflösung von Fibringerinnsele durch die Spaltung von Fibrin, degradiert Plasmin Proteine der Extrazellulären Matrix (EZM), die unter anderen aus den Adhäsionsproteinen, wie Fibrinogen, Laminin und Fibronectin, zusammengesetzt ist. Außerdem spaltet Plasmin Komponente der Basalmembran und aktiviert Matrixmetalloproteinasen, Wachstumsfaktoren, Hormone sowie Blutgerinnungsfaktoren [7]. Plasmin unterstützt aber auch verschiedene Tumorzellen bei der Metastasierung und Invasion z.B. im Gehirn, in der Brust, im Magen und Dickdarm. Bei diesen Tumoren entdeckte man eine deutlich erhöhte Expression des Plasminogen-Aktivator-Systems und eine positive Korrelation mit deren Malignität [12]. Die Induktion der proteolytischen Gewebedegradation durch die Aktivierung des Plasminogens auf Zelloberflächen hat signifikante Auswirkungen auf Wundheilungs- und Gewebeerneuerungsprozessen, die Embryogenese und die Ausbreitung und Metastasierung von Tumorzellen [11]. Plasmin unterstützt zudem die Immunevasion pathogener Mikroorganismen indem es das Immunglobulin G (IgG) spaltet [13].

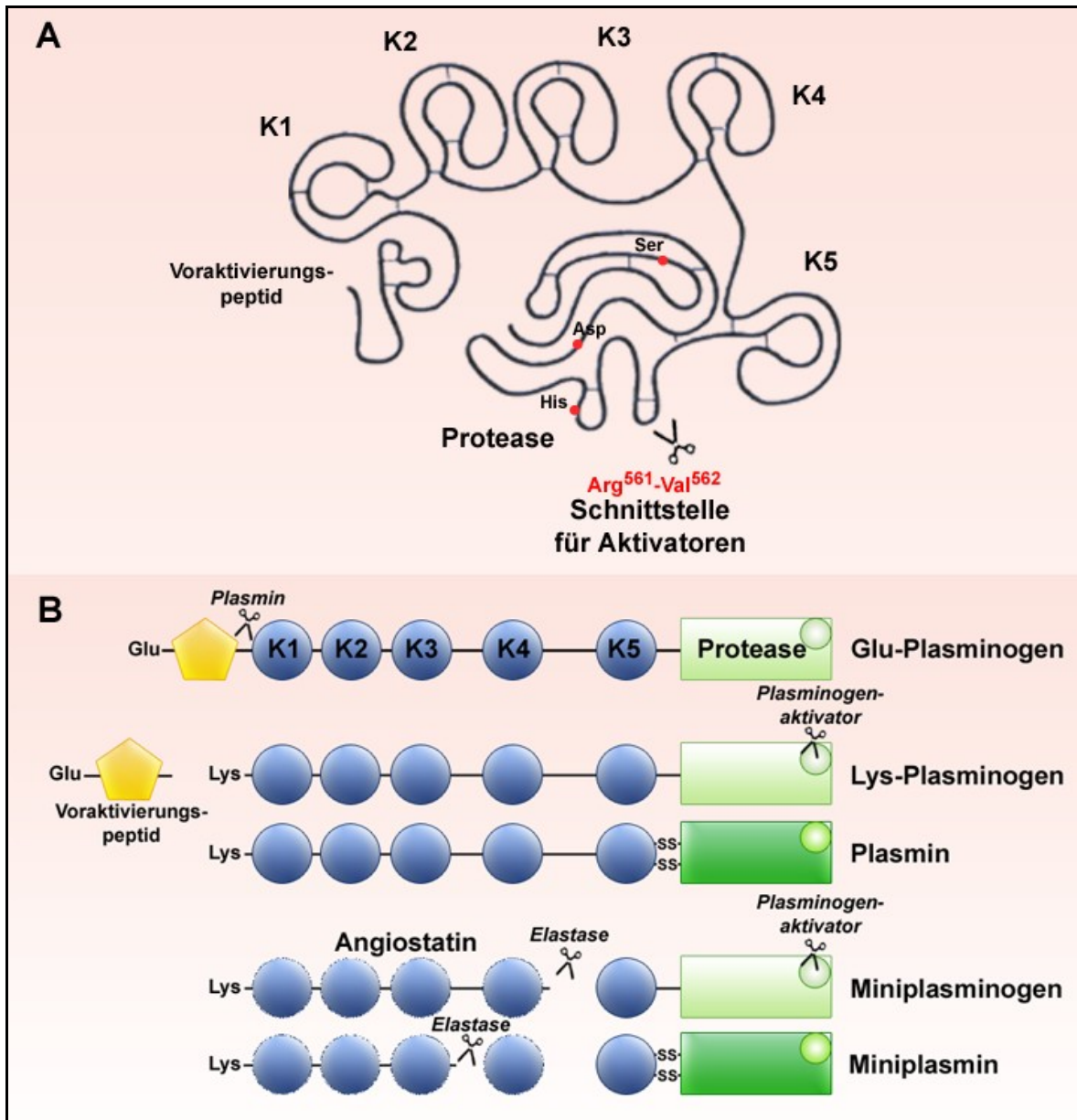


Abbildung 2: Die Struktur des Plasminogens.

A) Plasminogen besteht aus einem Voraktivierungspeptid, fünf homologen Kringeldomänen (K1-K5) und einer C-terminalen Protease-Domäne. Das Zymogen Plasminogen wird durch spezifische Plasminogenaktivatoren an der Schnittstelle zwischen Arg⁵⁶¹-Val⁵⁶² proteolytisch gespalten (Schere) und zu Plasmin aktiviert. Das katalytische Zentrum bilden die Aminosäuren Serin (Ser), Aspartat (Asp) und Histidin (His) in der C-terminalen Protease-Domäne (rote Punkte).

B) Im Serum liegt Plasminogen in zwei Formen vor: das Glutamat (Glu)- und das Lysin (Lys)-Plasminogen. Das Glu-Plasminogen wird autokatalytisch durch Plasmin, durch die Abspaltung des Voraktivierungspeptides, zu Lys-Plasminogen generiert. Das inaktive Plasminogen (hellgrün) wird durch spezifische Aktivatoren zur aktiven Form Plasmin (dunkelgrün) gespalten. Die Elastase spaltet Plasmin(ogen) in weitere funktionelle Einheiten. Dazu gehören das Angiostatin (K1-4), das ebenfalls zu Miniplasminogen (K5-Protease), das ebenfalls zu Miniplasmin aktiviert wird und das Angiostatin (K1-4), das weiter zu K1-3 und K4 gespalten wird.

Die menschliche Elastase ist eine Protease, die Plasminogen zwischen den Kringeldomänen K4 und K5 spaltet. Dabei entstehen zwei Fragmente: das Angiostatin (K1-4) und das Miniplasminogen (K5 mit Protease-Domäne) mit einer molekularen Größe

von 53 und 39 kDa. Im weiteren Verlauf der proteolytischen Spaltung entstehen die Fragmente K1-3 und K4 mit einem Molekulargewicht von 44 bzw. 10 kDa (**Abbildung 2B**).

Angiostatin (K1-4) inhibiert die Bildung von neuen Blutgefäßen (Angiogenese), indem es proliferierende Endothelzellen angreift. Das Angiostatin-ähnliche Molekül K1-3 ist in seiner antiangiogenen Wirkung potenter als Angiostatin und inhibiert die Migration von Endothelzellen [14]. Das kleinere Fragment K4 besitzt eine Lysinbindestelle und ist ein ineffektiver Inhibitor der Proliferation von Endothelzellen [2]. Miniplasminogen wird wie Plasminogen zu Miniplasmin aktiviert. Miniplasmin besitzt eine höhere fibrinolytische Aktivität und eine zehnfach geringere Empfindlichkeit gegenüber dem Regulator α_2 -Antiplasmin als Plasmin [9, 15]. Die Rolle von Miniplasminogen ist noch nicht weitgehend untersucht.

1.1.3. Die Plasminogenaktivatoren

1.1.3.1. Die menschlichen Plasminogenaktivatoren

Menschliche sowie bakterielle Plasminogenaktivatoren konvertieren das Zymogen Plasminogen zur aktiven Serinprotease Plasmin (**Abbildung 3**). Zu den menschlichen Aktivatoren gehören der „urokinase-type“ (uPa) und der „tissue-type“ (tPa) Plasminogenaktivator. UPa ist ein einzelkettiges Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 53 kDa. UPa ist ebenfalls ein Zymogen, das durch Plasmin proteolytisch gespalten und zu einem zweikettigen aktiven Protein generiert wird. UPa besitzt wie Plasminogen eine Kringeldomäne, gefolgt von einer Wachstumsfaktor- und einer Serinproteasedomäne im C-Terminus. UPa wird von verschiedenen Zellen sekretiert, vor allem jedoch von Krebszellen und spielt eine große Rolle in der Tumorbilogie [16]. TPa besitzt ein Molekulargewicht von 70 kDa und ist ebenfalls ein einzelkettiges Glykoprotein. Wie uPa wird tPa durch Plasmin in ein zweikettiges Molekül gespalten und zur Protease aktiviert. TPa wird von Endothelzellen, vor allem aber von Krebszellen sekretiert und besitzt eine N-terminale Finger-Domäne, gefolgt von einer Wachstumsfaktor- und zwei Kringeldomänen [10]. TPa ist ausschließlich verantwortlich für die Generierung von Plasmin [17].

1.1.3.2. Die bakteriellen Plasminogenaktivatoren

Neben den zwei menschlichen Plasminogenaktivatoren sezernieren verschiedene Mikroorganismen eigene Plasminogenaktivatoren um effektiv das rekrutierte Plasminogen

zu aktivieren und die Aktivität von Plasmin für sich zu nutzen. Die Streptokinase (SK) wird von *Streptococcus pyrogenes* exprimiert und ist ein sehr spezifischer Plasminogenaktivator. Nach der Expression wird die SK in den extrazellulären Raum sezerniert und geht mit Plasminogen einen Komplex ein. Die SK induziert eine Konformationsänderung in der Protease-Domäne und aktiviert Plasminogen zu Plasmin. Dabei erfolgt die Aktivierung zu Plasmin ohne Proteolyse [18]. Dieser Komplex ist gegenüber dem Plasmininhibitor α_2 -Antiplasmin unempfindlich. Die Staphylokinase (SAK) wird von *Staphylococcus aureus* exprimiert. Die SAK geht ebenfalls mit Plasminogen einen Komplex ein und auch hier findet die Aktivierung ohne proteolytische Spaltung statt. Jedoch ist dieser Komplex empfindlich für α_2 -Antiplasmin [19]. Der Plasminogenaktivator (Pla) von *Yersinia pestis* ist eine Oberflächen-gebundene Aspartat-Protease, die Plasminogen zu Plasmin proteolytisch spaltet [20]. Der Plasminogen-spezifische Regulator α_2 -Antiplasmin inhibiert Pla. Somit besitzt Pla eine große Rolle im Plasminogen-System sowie in der Pathogenese von *Yersinia* [20]. Die erst kürzlich identifizierte Protease Legionella Plasminogenaktivator (Lpa) von *Legionella pneumophila* ist ebenfalls in der Lage Plasminogen zu Plasmin zu konvertieren, welches funktionell aktiv ist [21].

1.1.4. Die Plasminogenregulatoren

Das Plasminogensystem liegt unter strenger Kontrolle und die Inhibitoren sind in zwei Gruppen unterteilt (**Abbildung 3**). Die Plasminogenaktivator-Inhibitoren-1, -2 und -3 (PAI-1, PAI-2, PAI-3) gehören zu den Inhibitoren der Gruppe I und blockieren die Aktivität der Plasminogenaktivatoren uPa und tPa. Die Glykoproteine PAI-1 - PAI-3 besitzen ein Molekulargewicht von 54, 70 bzw. 57 kDa und gehören zu den Serinproteaseninhibitoren (Serpine). Sie bilden mit uPa und tPa einen Komplex und blockieren deren proteolytische Funktion. Zusätzlich bindet PAI-1 das EZM-Protein Vitronektin und stabilisiert somit seine aktive Form [22, 23].

Die Inhibitoren der Gruppe II blockieren direkt das aktive Enzym Plasmin. Zu dieser Gruppe gehören das α_2 -Antiplasmin und das α_2 -Makroglobulin. Der spezifische Plasminogeninhibitor α_2 -Antiplasmin bindet Plasminogen bzw. Plasmin in K1-3 über die Lysinbindestellen und bildet ebenfalls einen Komplex [24]. Das α_2 -Makroglobulin ist ein sehr großes Glykoprotein, das sowohl Plasmin als auch die Aktivatoren uPa und tPa bindet. Diese Inhibitoren sind in Lösung aktiv, wobei zellgebundenes Plasmin vor α_2 -Antiplasmin und α_2 -Makroglobulin geschützt ist [10].

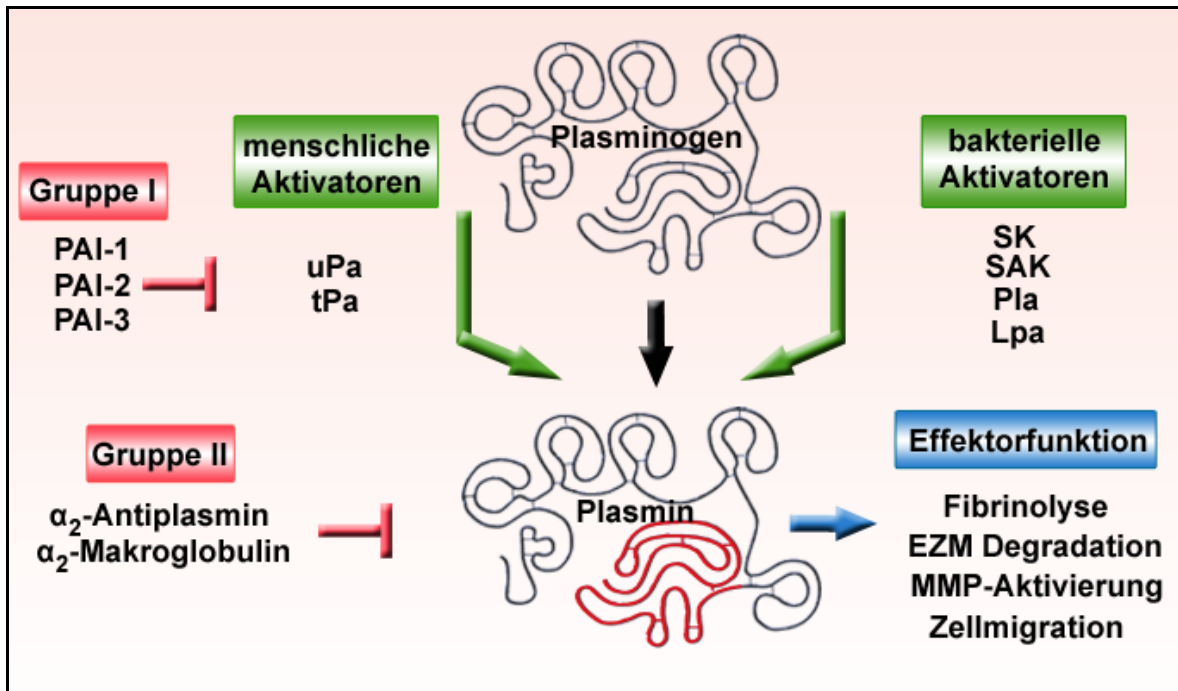


Abbildung 3: Das Plasminogensystem liegt unter strenger Kontrolle.

Menschliche Aktivatoren, wie der „urokinase-type“ und „tissue-type“ Plasminogenaktivator (uPa und tPa) oder bakterielle Aktivatoren, wie die Streptokinase (SK), die Staphylokinase (SAK), und die Aktivatoren von *Y. pestis* und *L. pneumophila* (Pla und Lpa) konvertieren Plasminogen zur aktiven Serinprotease Plasmin. Das Plasminogen-System liegt an verschiedenen Stellen unter Kontrolle von Inhibitoren. Diese Inhibitoren sind in zwei Gruppen unterteilt. Die Inhibitoren-Gruppe I, zu der die Plasminogenaktivator-Inhibitoren-1, -2 und -3 (PAI-1, -2 und -3) gehören, inhibieren die Plasminogenaktivatoren uPa und tPa. Die Inhibitoren α₂-Antiplasmin und α₂-Makroglobulin blockieren das aktive Zentrum von Plasmin und gehören der Inhibitoren-Gruppe II an. Plasmin ist das Schlüsselenzym in der Fibrinolyse und spaltet Fibrin(ogen), aber auch Komponente der Extrazellulären Matrix (EZM), aktiviert Matrixmetalloproteinasen (MMP) und ist für die Migration von verschiedenen Zellen verantwortlich.

1.1.5. Plasminogen bringt pathogene Mikroorganismen mit dem menschlichen Fibrinolyse-System in Kontakt

Viele pathogene Mikroorganismen nutzen menschliche Serumproteine zu ihrem Vorteil. Das fibrinolytische System spielt dabei eine sehr große Rolle und die Eigenschaft von Plasminogen, Fibrin(ogen) zu binden und anschließend zu spalten, wird von pathogenen Mikroorganismen effektiv ausgenutzt. Fibrin ist nicht nur Bestandteil eines Fibringerinnsels sondern ist auch ein Hauptbestandteil der EZM. Die EZM umgibt Zell-Zell-Verbände und besitzt somit eine schützende und stabilisierende Funktion für Zellen. Pathogene Mikroorganismen kolonisieren an ihren entsprechenden Epithelzellen und dringen anschließend über das Gewebe in den Blutkreislauf ein. Die Interaktion zwischen pathogenen Mikroorganismen und Wirt wird intensiv untersucht und es ist gezeigt, dass Plasmin(ogen) und das EZM-Protein Fibrinogen bei der Interaktion zwischen Pathogen und Wirt eine wichtige Rolle einnehmen [19].

Für einige Bakterien ist der Prozess der „Bakteriellen Metastase“ beschrieben. Dieser Prozess ähnelt dem Mechanismus der Metastisierung von Tumorzellen, indem diese Zellen an Laminin binden und Plasminogen aktivieren [25]. Bei der „bakteriellen Metastase“ binden pathogene Mikroorganismen Plasminogen an ihrer Oberfläche und gebundenes Plasminogen wird durch menschliche oder bakterielle Aktivatoren zu Plasmin aktiviert. Das gebundene Plasminogen vermittelt den Kontakt der Mikroorganismen über die EZM an die Zielzellen. Aktiviertes Plasmin spaltet die EZM-Proteine und zerstört die stabile Struktur der EZM. Dadurch sind die Zellen nicht mehr ausreichend geschützt und die pathogenen Mikroorganismen dringen in die Zellen ein. Ist Plasmin an der bakteriellen Oberfläche gebunden, ist Plasmin für den Regulator α_2 -Antiplasmin nicht mehr zugänglich und ist konstant funktionell aktiv. Die pathogenen Mikroorganismen nutzen somit Plasminogen zum einen für die Adhäsion und Kolonisation, durch die Bindung an einzelne EZM-Proteine und zum anderen zur Invasion, durch die Degradierung von EZM-Proteinen [26, 27].

Die Plasminogen-Bindung ist für eine große Anzahl von pathogenen Mikroorganismen gezeigt und untersucht (**Tabelle 1**). Gram-positive Bakterien, die invasive Erkrankungen verursachen, nutzen Wirtsproteine für ihren Angriff und die Verbreitung im Gewebe [28]. Für einige Arten von *Streptococcus* sind bereits mehrere Plasminogen-Bindeproteine identifiziert und untersucht. *S. pneumoniae* exprimiert eine Reihe von Plasminogen-Bindeproteinen wie die Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), die α -Enolase, das Plasminogen und Fibronektin-bindende Protein B (PfbB) und das Cholin-bindende Protein E (CBPE) [29]. Einige dieser Proteine werden auch von anderen *Streptococcus*-Arten exprimiert. Das Plasminogen-bindende-M-like-Protein (PAM) von *S. pyogenes* bindet Plasminogen mit einer sehr hohen Affinität und ummantelt die Streptokokken mit Plasminogen, welches durch die SK oder menschliche Plasminogenaktivatoren an der Oberfläche aktiviert wird [30]. *S. canis* exprimiert das „M-like“ Protein (SCM), welches Plasminogen und Miniplasminogen bindet und die bakterielle Transmigration unterstützt [28]. Für die Staphylokokken ist bisher nur der Plasminogenaktivator SAK als Plasminogen-bindendes Protein identifiziert [31].

Die Bindung von Plasminogen von verschiedenen Gram-negativen Bakterien ist erstmalig in einer Studie aus dem Jahr 1989 beschrieben und zeigt die Bindung von Plasminogen an der Oberfläche von *Haemophilus influenzae* und von *Bordetella catarrhalis*. Auch für einige *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme ist eine Plasminogen-Bindung dargestellt [32]. Für *H. influenzae* und *P. aeruginosa* sind bereits Plasminogen-Rezeptoren identifiziert und genauer beschrieben. Die Aspartase ist als das erste Plasminogen-Bindeprotein von *H. influenzae* beschrieben und später das Protein Protein E (PE) als Hauptbindeprotein

identifiziert [Manuskript 1] [33]. Der Elongationsfaktor Tu (Tuf) und die Lipoprotein-Dehydrogenase (Lpd) von *P. aeruginosa* binden Plasminogen an ihrer Oberfläche und nutzen gebundenes Plasminogen für ihre Kolonisation an menschlichen Zellen [34], (Manuskript in Vorbereitung, Hallström et al., 2011). Für die Gattung der *Borrelia* ist ebenfalls eine Plasminogen-Bindung gezeigt und eine Rolle der Plasminogen-Bindung bei der Verbreitung und Invasion im Wirtsgewebe, sowie in der Immunevasion nachgewiesen. *Borrelia burgdorferi* bindet Plasminogen über die erst kürzlich beschriebenden „complement regulator-acquiring surface proteins“ -3, -4 und -5 (CRASP-3 - CRASP-5) [Manuskript 2], aber auch das „outer surface protein“ A (OspA) und das *Borrelia* Plasminogen Bindeprotein (BPBP) binden Plasminogen an der Oberfläche [35]. *B. recurrentis* exprimiert das multifunktionale „human complement and plasminogen protein“ A (HcpA), das ebenfalls Plasminogen und auch Komplementregulatoren bindet [36].

Eine weitere Art von Spirochäten binden Plasminogen an ihre Oberfläche. Die Spirochäten *Leptospira interrogans* exprimieren acht Plasminogen-Bindeproteine, wobei das Leptospiral Endostatin-ähnliche Protein A (LenA) am besten untersucht ist [37]. Plasminogen-ummantelte *Leptospira* spalten Fibrinogen und vermitteln somit die Invasion der *Leptospira* [38]. Das Darmbakterium *Helicobacter pylori* exprimiert zwei Plasminogen-bindende Proteine (pgbA und pgbB) [39], die an der Oberfläche verankert sind. Gebundenes Plasminogen wird durch den menschlichen Aktivator uPa zu Plasmin aktiviert und trägt zur Gewebspenetration sowie zur Pathogenese bei [40]. Für *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* und *K. oxytoca* ist in der Studie von 1989 keine Plasminogen-Bindung gezeigt [32]. Jedoch ist später für *E. coli* eine Bindung von Plasminogen durch G-Fimbrien und die Flagellen nachgewiesen [41].

Viele pathogene Mikroorganismen binden Plasminogen an ihre Oberfläche. Einige davon exprimieren ihre eigenen Plasminogenaktivatoren, die das gebundene Plasminogen zur aktiven Serinprotease Plasmin aktivieren. Das gebundene Plasmin(ogen) verleiht den Mikroorganismen einen effizienten Virulenzfaktor. Die folgende Tabelle (**Tabelle 1**) fasst die beschriebenen Plasminogen-Bindeproteine zusammen und zeigt die Verbreitung sowie die Wichtigkeit der Plasminogen-Bindung für Mikroorganismen.

Tabelle 1: Prokaryontische Plasminogen-Bindeproteine und Aktivatoren.

Mikroorganismus	Bindeprotein	kDa	Literatur
<i>B. burgdorferi</i>	<i>Borrelia</i> Plasminogen-Bindeprotein (BPBP-70)	70	[42]
	„outer surface protein“ A (OspA)	30	[43]
	„outer surface protein“ C (OspC)	23	[44]
	„complement regulator-acquiring surface proteins“ CRASP-3/ErpP, CRASP-4/ErpA, CRASP-5/ErpC	19-21	diese Arbeit
<i>B. spielmanii</i>	<i>B. spielmanii</i> CRASP-3 (BsCRASP-3)	15	[45]
<i>B. recurrentis</i>	„human complement and plasminogen Protein“ A (HcpA)	17	[36]
<i>B. catarrhalis</i>	Unbekannt	-	[32]
<i>E. coli</i>	G-Fimbrien	27	[41]
	Flagelle	-	[46]
<i>H. influenzae</i>	Aspartase	55	[33]
	Protein E (PE)	16	diese Arbeit
<i>H. pylori</i>	Plasminogen-Bindeprotein A (pgbA)	55	[47]
	Plasminogen-Bindeprotein B (pgbB)	65	[48]
<i>L. pneumophila</i>	<i>Legionella</i> Plasminogenaktivator (Lpa)	33	[21]
<i>L. interrogans</i>	<i>Leptospira</i> Endostatin-ähnliche Protein A (LenA)	32	[37]
<i>N. meningitis</i> <i>N. gonorrhoeae</i>	Unbekannt		[49]
<i>P. carni</i>	Enolase	47	[50]
<i>P. aeruginosa</i>	Lipoprotein-Dehydrase (LPD)	43	n. p.
	Elongationfaktor Tu (Tuf)	43	[34]
<i>S. aureus</i>	Staphylokinase (SAK)	16	[51]
<i>S. canis</i>	<i>S. canis</i> „M-like“ Protein (SCM)	25	[28]
<i>S. pneumoniae</i>	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)	40	[29]
	α-Enolase	45	[52]
	Cholin-bindende Protein E (CBPE)	70	[53]
	Plasminogen- und Fibronektin-Bindeprotein B (PfbB)	120	[54]
<i>S. pyogenes</i>	α-Enolase (SEN)	47	[30]
	Plasminogen-bindene-M-like-Protein (PAM)	43	[55]
	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)	36	[56]
	Streptokinase (SK)	52	[57]
<i>S. uberis</i>	Streptokinase (SKC)	34	[58]
	Plasminogen-Aktivatorprotein A (PauA)	33	[59]
	Plasminogen-Aktivatorprotein B (PauB)	45	[60]
<i>Y. pestis</i>	Plasminogenaktivator (Pla)	35	[20], [61]

n.p.: nicht publiziert

Für die pathogene Hefe *Candida albicans* sind neun Plasminogen-Bindeproteine identifiziert und bereits einige, wie die Phosphoglycerat-Mutase-1 (Gpm1) und das pH-regulierte Antigen-1 (Pra1), genauer beschrieben [62]. *Candida* bindet Plasminogen als Hefe- und Hyphenform und nutzt Plasminogen, welches durch menschliche Plasminogenaktivatoren zu Plasmin generiert wird, zur Kolonisation durch Spaltung der EZM-Proteine. Eine Plasminogen-Bindung wurde auch für die Konidien des menschlichen Hefepilzes *Aspergillus fumigatus* beobachtet, jedoch sind die Rezeptoren noch unbekannt (Tabelle 2) [63].

Tabelle 2: Plasminogen-Bindeproteine von pathogenen Hefen.

Pathogene Hefe	Bindeprotein	kDa	Literatur
<i>C. albicans</i>	<u>P</u> hosphoglycerat- <u>M</u> utase-1 (Gpm1)	36	[64]
	<u>p</u> H- <u>r</u> egulierte <u>A</u> ntigen-1 (Pra1)	31	[65]
	Peroxisomale Katalase (CTA1)	56	[62]
	<u>T</u> ranskriptionse <u>l</u> ongation <u>f</u> aktor 1 (TEF)	48	
	<u>A</u> lkohol <u>d</u> e <u>h</u> ydrogenase 1 (ADH1)	43	
	<u>T</u> hiol- <u>s</u> pezifisches <u>A</u> ntio <u>x</u> idatives Protein (TSA1)	23	
	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (TDH3)	34	
	<u>P</u> hosphoglycerat <u>k</u> inase (PGK1)	45	
	<u>F</u> ruktose- <u>b</u> isphosphat- <u>A</u> ldolase (FBA1)	42	
<i>A. fumigatus</i>	Unbekannt	-	[63]

Eine Bindung von Plasminogen an die Parasiten *Trypanosoma cruzi epimastigotes* und *Leishmania mexicana* ist ebenfalls gezeigt. Jedoch ist der Plasminogen-Rezeptor noch nicht identifiziert [66, 67]. Diese Studien zeigen, dass sich eine Mehrzahl von pathogenen Erregern ein einzelnes menschliches Serumprotein zu Nutze machen und es als Waffe gegen den menschlichen Organismus einsetzen. Die Bindung von Plasmin(ogen) ist somit ein weit verbreiteter und sehr wirkungsvoller Mechanismus.

Neben Plasminogen interagieren Bakterien auch direkt mit dem EZM-Protein Fibrinogen, einem weiteren Bestandteil des Fibrinolyse-Systems. *S. pyrogenes* bindet Fibrinogen mittels dem Extrazellulären Fibrinogen-bindenden Protein (Efb) oder des M-Protein an seine Oberfläche [68-70]. Die mit Fibrinogen umgebenen Bakterien entwickelten eine Strategie, um sich vor dem Immunsystem zu schützen und maskieren sich so vor der Phagozytose von Makrophagen (Abschnitt 1.2.2.4.).

1.2. Das menschliche Immunsystem

Das menschliche Immunsystem schützt den Menschen schnell und effektiv vor dem Angriff pathogener Mikroorganismen. Diese Aufgabe ist möglich durch das genau regulierte Zusammenspiel spezialisierter Immunzellen und effektorischen sowie regulatorischen Proteinen, wie den Komplementproteinen, Zytokinen und Chemokinen. Bei einer Infektion durch pathogene Mikroorganismen, überwinden die Mikroorganismen zunächst natürliche Barrieren, z.B. die Haut (mechanisch), Verdauungstrakt (chemisch) oder symbiotische Bakterien (biologisch) und umgehen anschließend das menschliche Immunsystem. Zuerst erkennt das angeborene Immunsystem die fremden Mikroorganismen, welches eine relativ geringe Spezifität für Mikroorganismen besitzt. Die angeborene Immunantwort ist gekennzeichnet durch allgemeine Rezeptoren, wie den „*Toll-like*“-Rezeptoren (TLR) und die „*pattern recognition*“-Rezeptoren (PRRs), die „*Microbe*“-assoziierte Molekülstrukturen (MAMPs) von Mikroorganismen erkennen. Anschließend kommt es zur spezifischen Immunantwort (erworbene Immunsystem), die auf eine hohe Spezialisierung durch spezifische Rezeptoren auf spezialisierten Zellen beruht.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit Komplementsystem der angeborenen Immunantwort. Für das Verständnis des gesamten Immunsystems und die Rolle der Immunantwort bei einer Infektion von pathogenen Mikroorganismen, wird in den folgenden Abschnitten ein Überblick über die wichtigen Abschnitte der Immunantwort gegeben und der Ablauf und die Funktion des Komplementsystems vertieft.

1.2.1. Die natürlichen Barrieren des Menschen

Die erste Barriere, die pathogene Mikroorganismen bei ihrer Infektion überwinden müssen, sind die natürlichen Barrieren des menschlichen Organismus. Der Mensch schützt sich durch Oberflächenepithelien, wie z.B. die Haut und die Oberflächenepithelien des Gastrointestinal-, das Respirations- und des Urogenitalsystems, die eine mechanische Barriere zwischen Körperinneren und der Außenwelt mit ihren Mikroorganismen bilden. Diese Oberflächenepithelien sind durch „*tight junctions*“ fest miteinander verbunden und bilden dadurch einen starken Zell-Zell-Verband. Eine Ausscheidung pathogener Mikroorganismen erfolgt durch die Zilienbewegung des Flimmerepithels in der Lunge oder die Peristaltik der Hohlorgane, wie z.B. des Darms. Diese Oberflächenepithelien sind außerdem in der Lage Substanzen zu produzieren, die die chemische Barriere bilden. Dazu gehören anti-bakterielle Enzyme und Proteine, die Mikroorganismen in ihrem Wachstum inhibieren oder abtöten. Antibakteriell wirken

Enzyme, wie das von dem Speichel oder in Tränenflüssigkeiten sezernierte Lysozym und die Phospholipase A. Darmepithelien und Epithelien des Respirations- und Urogenitaltraktes sezernieren antibakterielle Peptide, wie das α -Defensin und das β -Defensin. Cathelicidin ist ein weiteres antibakterielles Protein, das in die Zellwand z.B. von Gram-positiven Bakterien eingebaut wird und zum Verlust von Ionen und kleineren Molekülen führt. Eine weitere chemische Barriere gegen pathogene Mikroorganismen bildet der geringe pH-Wert im Magen und in der vaginalen Schleimhaut.

Ein weiterer Schutz ist durch die Assoziation der Epithelien mit kommensalen Bakterien, die eine normale Flora bilden, vorhanden. Diese kommensalen Bakterien konkurrieren mit den pathogenen Mikroorganismen um Nährstoffe und Anheftungsstellen an der Zelloberfläche. Jedoch sind diese kommensalen Bakterien empfindlich gegenüber Antibiotika, so dass sie durch antibiotikaresistente pathogene Mikroorganismen leicht verdrängt werden können.

1.2.2. Das angeborene Immunsystem

Nach erfolgreichem Überwinden der natürlichen Barrieren erkennt das angeborene Immunsystem die pathogenen Mikroorganismen. Das angeborene Immunsystem läuft in einer frühen Phase der Infektion ab und greift die Mikroorganismen sehr schnell und effektiv an. Neben verschiedenen Immunzellen, wie Leukozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten, besteht das angeborene Immunsystem aus einer „*triggered-enzyme*“-Enzymkaskade, dem Komplementsystem.

1.2.2.1. Das Komplementsystem

Das Komplementsystem bildet das wichtigste humorale Effektorsystem der angeborenen Immunantwort und wird direkt durch pathogene Mikroorganismen oder durch Antigen-Antikörper-Reaktionen aktiviert. Der Ablauf des Komplementweges führt zu drei Ereignissen: (1) die Opsonisierung von Zielzellen durch C3b, C4b und iC3b, (2) die Anlockung und Aktivierung von Entzündungszellen durch C3a, C4a und C5a und (3) die direkte Lyse von Zielzellen durch Bildung des Terminalen Komplement-Komplex („*terminal complement complex*“, TCC) [71]. Außerdem findet ein Abtransport von Immunkomplexen durch C3b statt [72, 73]. Das Komplementsystem verläuft dabei in drei Abschnitten: (1) die Aktivierung, (2) die Bildung der C3-Konvertase und (3) das Formen des TCC (**Abbildung 4**). Das Zusammenspiel von mehr als 40 Komponenten, die im

Plasma löslich oder membrangebunden vorkommen, machen das Komplementsystem zu einer effektiven Waffe [74, 75].

Die Aktivierung des Komplementsystems erfolgt auf drei verschiedenen Wegen: (1) den alternativen, (2) den Lektin- und (3) den klassischen Weg. Verschiedene bakterielle Bestandteile wie Zymosan (eine Zellwandkomponente von Hefen), Dextran (Speicherkohlenhydrate von Hefen und einigen Gram-positiven Bakterien) oder Endotoxin (Lipopolysaccharid von Gram-negativen Bakterien) initiieren den alternativen Weg ohne die Mitwirkung von Antikörpern. Die Aktivierung erfolgt durch die spontane Hydrolyse von C3 und führt zur Bildung von C3(H₂O), das von Faktor B gebunden wird. Die Plasmaprotease Faktor D erkennt den C3bBb-Komplex und spaltet Faktor B in die Bestandteile Ba und Bb. Bb bleibt an C3(H₂O) gebunden und bildet das aktive Enzym der C3-Konvertase des alternativen Weges. Die Funktion des kleineren Fragments Ba ist bisher noch nicht bekannt. Ein weiterer Aktivierungsmodus des Komplementsystems ist der Lektin-Weg. Das Mannan-bindende Lektin (MBL), das dem C1q des klassischen Weges ähnlich ist, erkennt Mannose und ähnliche Zucker, die auf zahlreichen Mikroorganismen zu finden sind. Das MBL reagiert mit bestimmten Zymogen-Proteasen, den MBL-assoziierten Serin-Proteasen (MASP-1 und MASP-2). Der dritte Weg der Komplementaktivierung ist der klassische Weg. Der klassische Weg wird durch Antigen-Antikörper-Komplexe initiiert, die z.B. an pathogenen Oberflächen gebunden sind. Das C1q-Molekül erkennt die gebundenen Antigen-Antikörper-Komplexe und bildet zusammen mit C1r und C1s den C1-Komplex. Die Bindung der MASPs an das MBL bzw. des C1q-Komplexes an den Antigen-Antikörper-Komplex führt zu einer Konformationsänderung der MASPs bzw. des C1-Komplexes und aktiviert die autokatalytisch wirkende enzymatische Aktivität von MASP-2 bzw. C1r und C1s zu einer aktiven Serinprotease. Ab dieser Stelle laufen der Lektin- und der klassische Weg gemeinsam ab. Diese Serinproteasen spalten C4 in C4b und C4a. C4b bindet an die Oberflächen von pathogenen Mikroorganismen und bindet C2, ein weiteres Komplementprotein. Das gebundene C2 wird ebenfalls von den Serinproteasen gespalten und es entstehen C2b und C2a. C2a bildet zusammen mit C4b die C3-Konvertase (C4b2a) des Lektin- und des klassischen Weges. Die kleineren Moleküle C4a und C2a sind Peptidentzündungsmediatoren und C2b ist eine Vorstufe des vasoaktiven C2-Kinins.

Die an Oberflächen gebildete C3-Konvertase wird von Faktor P (Properdin) stabilisiert und besitzt bei allen drei Wegen die gleiche enzymatische Aktivität [76]. Die C3-Konvertase spaltet C3-Moleküle in die Bestandteile C3b und C3a, wobei ein großer Teil von C3b durch Hydrolyse inaktiviert wird. Einige C3b-Moleküle binden jedoch kovalent über ihre reaktive Thioestergruppe an die Oberfläche von Körperzellen oder lagern sich in großen

Mengen an Oberflächen von pathogenen Mikroorganismen ab [77]. Das entstandene C3b besitzt zwei Funktionen: (1) als Opsonin und (2) die Bildung der C5-Konvertase. Opsonine erleichtern den Kontakt von Phagozyten an Mikroorganismen. Die auf den Mikroorganismen abgelagerten C3b-Moleküle wirken als Opsonin und bilden eine Hülle, die von Phagozyten erkannt werden und denen das Signal zur endgültigen Zerstörung der pathogenen Mikroorganismen geben. Beim alternativen Weg bindet Faktor B und Faktor D an C3b und bildet erneut die C3-Konvertase des alternativen Weges („*amplification loop*“).

Die C5-Konvertase entsteht aus der Bindung eines weiteren C3b-Moleküls an die C3-Konvertase des alternativen bzw. des Lektin- und klassischen Weges. Die Protease Bb des alternativen bzw. C2a des Lektin- und des klassischen Weges spaltet C5-Moleküle in C5b und C5a. Das C5b-Molekül leitet die Bildung des terminalen TCC ein. C5b reagiert dabei mit den Komplementproteinen C6 und C7 und bildet den C5b67-Komplex, der mit C8 reagiert. Anschließend bindet C9 und polymerisiert zu einer Pore. Diese Pore ist ein Hohlzylinder und ragt nach seiner Bindung an die Lipiddoppelschicht durch die gesamte Zellmembran. Durch diese Pore kommt es zu einem Influx von Na^+ -Ionen in die Zelle und letztendlich zu deren Lyse.

Die beim Ablauf des Komplementsystems entstandenen kleineren Fragmente C4a, C3a und C5a sind Peptidentzündungsmediatoren oder auch Anaphylatoxine. Anaphylatoxine locken Entzündungszellen wie z.B. Mastzellen, Neutrophile und Makrophagen an und regen diese zur Ausschüttung von Mediatoren wie Histamin und $\text{TNF-}\alpha$ an. Dabei ist C5a gegenüber C3a und C4a ein potenteres Anaphylatoxin und verstärkt zusätzlich die Phagozytose von opsonisierten Pathogenen. Die Anaphylatoxine induzieren Muskelkontraktionen, was zu einem Anstieg der Fließgeschwindigkeit und zur Gefäßpermeabilität führt.

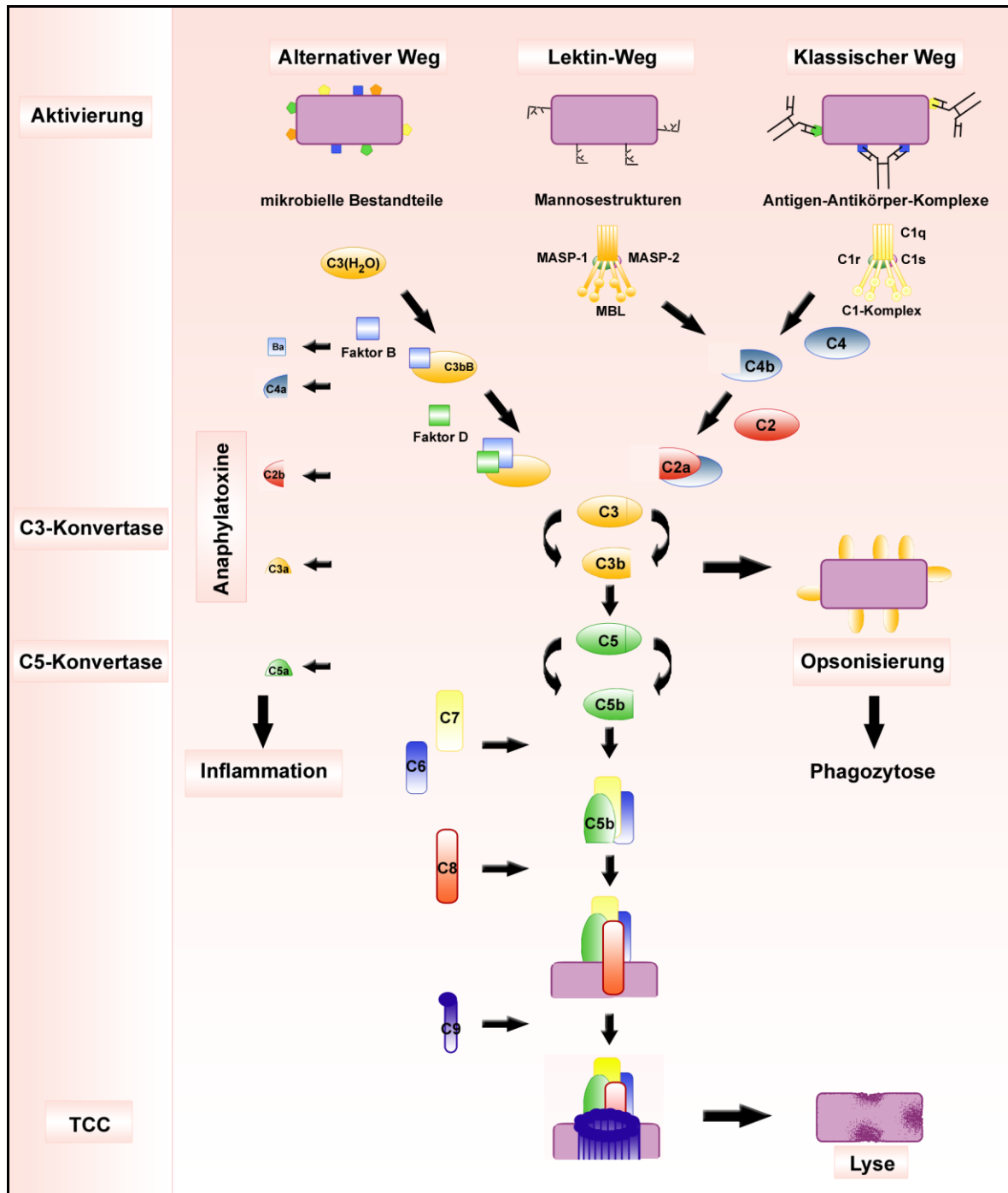


Abbildung 4: Der Ablauf des Komplementsystems.

Die Aktivierung des Komplementsystems erfolgt über drei Wege, den alternativen-, den Lektin- und den klassischen Weg. Alle drei Wege führen zur Bildung der C3-Konvertase, die im weiteren Verlauf mit der Bindung eines weiteren C3b-Moleküls die C5-Konvertase bildet. Das entstandene C3b bindet außerdem als Opsonin an pathogene Mikroorganismen und führt zu einer erleichterten Phagozytose. Die terminale Reaktion beginnt mit der Bildung des TCC aus den Komplementproteinen C5, C6, C7, C8 und C9, der auf der Oberfläche von Mikroorganismen eine Pore formt, die zur Lyse der Mikroorganismen führt. Die kleineren Spaltfragmente C3a, C4a und C5a wirken als Anaphylatoxine und lösen eine Inflammation aus. C2b ist die Vorstufe des Kinnins und die Funktion von Ba ist noch nicht bekannt.

1.2.2.2. Die Regulatoren des Komplementsystems

Das Komplementsystem liegt unter strenger Kontrolle verschiedener Regulatoren, die an unterschiedlichen Stellen in das Komplementsystem eingreifen. Eine Störung in der Regulation des Komplementsystems führt zu einer körpereigenen Zellzerstörung. Zu den Regulatoren zählen die Plasmaproteine C1-Inhibitor, C4-Bindeprotein (C4BP), Faktor H, das Faktor H-ähnliche Protein 1 („factor H-like protein-1“, FHL-1), sowie die Faktor H-verwandten Proteine 1 – 5 („complement factor H-related proteins“, CFHR1 - CFHR5), Faktor I, Properdin, Vitronectin und Clusterin. Neben den Flüssigphaseregulatoren gibt es membrangebundene Regulatoren wie CR1 (CD35), MCP, DAF, CD59 und HRF.

In dieser Arbeit wird auf die Regulatoren genauer eingegangen, die für das Verständnis dieser Arbeit wichtig sind. Pathogene Mikroorganismen werden vom Komplementsystem erkannt, schnell und effektiv abgetötet. Viele Mikroorganismen bedienen sich an den menschlichen Komplementregulatoren um sich zu maskieren und dem Komplementsystem zu entkommen. Einige Regulatoren die von pathogenen Mikroorganismen genutzt werden, werden in den folgenden Abschnitten beschrieben.

Zu einem der wichtigsten Regulatoren zählt Faktor H [78]. Faktor H ist ein 150 kDa großes Glykoprotein, das den alternativen Weg des Komplementsystems reguliert [79]. Im menschlichen Plasma liegt Faktor H in einer hohen Konzentration von ca. 500 µg/ml vor. Die Struktur von Faktor H ist durch 20 sich wiederholenden identische Einheiten, so genannten „short consensus repeats“ (SCR), charakterisiert. Diese SCR bestehen jeweils aus 60 Aminosäuren [78]. Faktor H bindet C3b und verhindert somit den Aufbau der C3-Konvertase im alternativen Weg des Komplementsystems. Dabei agiert Faktor H als Kofaktor für die Protease Faktor I, die C3b spaltet und inaktiviert (iC3b). Faktor H wirkt vor allem als Regulator in der Flüssigphase, aber auch an Zelloberflächen und unterscheidet dabei zwischen eigenen (nicht-aktivierend) und fremden (aktivierend) Oberflächen.

Faktor H ist Mitglied der Faktor H-Familie, zu der weitere sechs Regulatoren gehören: das FHL-1 und die fünf CFHR-Proteine (CFHR1 - CFHR5) (**Abbildung 5**) [80, 81]. FHL-1, ist ein Produkt des alternativen Spleißens des Faktor H-Gens, ist ebenfalls ein Regulator des alternativen Komplementweges und vermittelt Kofaktoraktivität für Faktor I. Das Glykoprotein FHL-1 besitzt eine Größe von 42 kDa und besteht aus sieben SCR-Einheiten, die mit den N-Terminus von Faktor H übereinstimmen und zusätzlich vier unique Aminosäuren am C-Terminus besitzen. Die CFHR-Proteine besitzen alle SCR-Einheiten, die strukturelle Ähnlichkeiten zu Faktor H aufweisen. Das CFHR1 ist das am besten untersuchte Mitglied der Faktor H-Familie. CFHR1 besitzt fünf SCR-Einheiten, wobei die SCR 3-5 eine 99-%ige Sequenzübereinstimmung zu den SCR 18-20 von

Faktor H zeigen. CFHR1 bindet, wie Faktor H, an C3b und Heparin und beeinflusst die Aktivität der C3- und C5-Konvertase sowie die Bildung des TCC [82]. Die Funktion der anderen CFHR-Proteine ist noch nicht vollständig untersucht. Die Nierenkrankheiten aHUS (atypisches Hämolytisches Urämisches Syndrom) und MPGN-II (Membranoproliferative Glomerulonephritis Typ II) und die Augenerkrankung AMD (Altersbedingte Makulardegeneration) sind mit Mutationen im Gen von Faktor H und mit dem Verlust von einzelnen CFHR-Proteine verbunden [79].

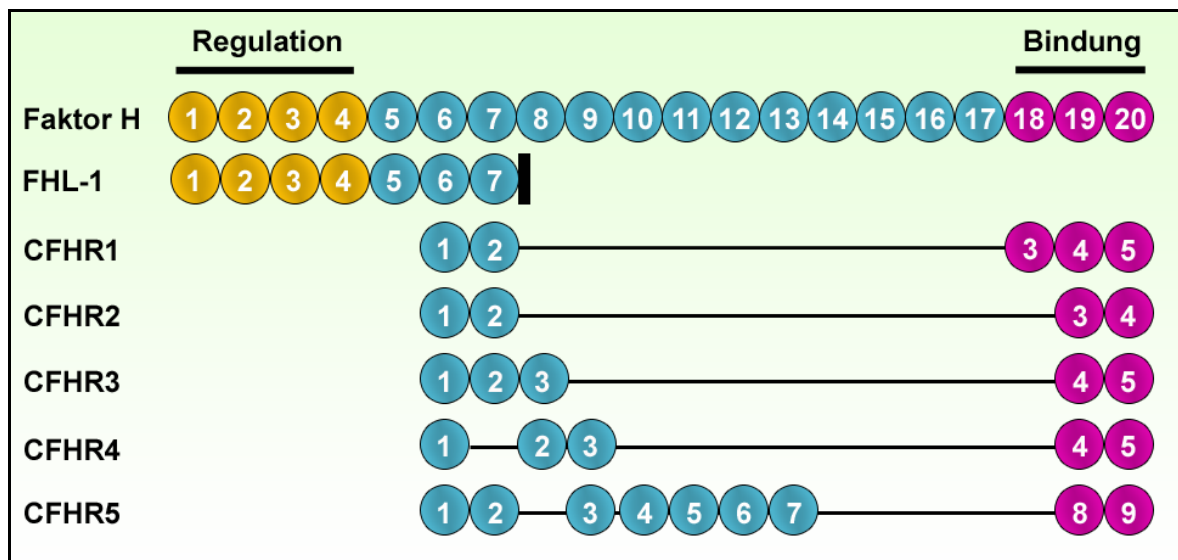


Abbildung 5: Die Faktor H-Familie.

Faktor H besteht aus 20 sich wiederholenden SCR-Einheiten. Die Faktor H-Familie besteht aus fünf Faktor H-verwandten Glykoproteinen (CFHR) und einem Faktor H-ähnlichen Protein (FHL-1). Alle besitzen homologe SCR-Einheiten zu Faktor H. Das FHL-1 besitzt zusätzlich vier unique Aminosäuren (schwarz). Die SCR-Einheiten in Gelb sind für die Regulation verantwortlich und die SCR-Einheiten in Violett vermitteln die Bindung an Oberflächen (Abbildung verändert nach [79]).

Das C4BP ist ein großes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 570 kDa. Das Protein ist ein Regulator des klassischen und des Lektin-Weges. Wie Faktor H inhibiert es die Bildung der C3-Konvertase und agiert als Kofaktor für Faktor I für die proteolytische Spaltung von C4b. C4BP besitzt sieben identische α -Ketten und eine β -Kette, die aus acht bzw. drei sich wiederholenden SCR-Einheiten bestehen (**Abbildung 6**) [83].

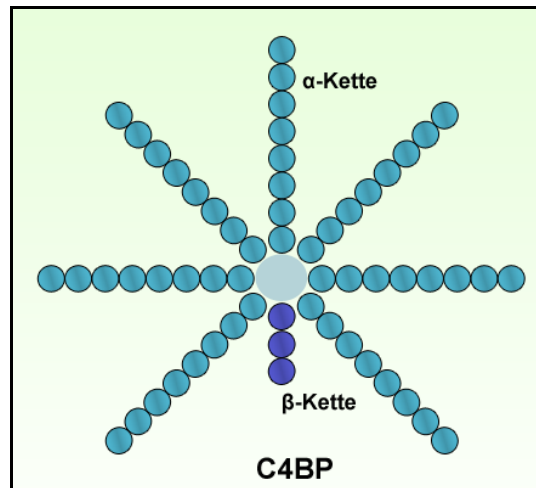


Abbildung 6: Die Struktur des Komplementregulators C4BP.

Das Glykoprotein C4BP besteht aus sieben α -Ketten und einer β -Kette mit acht bzw. drei sich wiederholenden SCR-Einheiten (Blau).

Vitronektin ist ein multifunktionales Glykoprotein, das neben Fibrinogen ein Bestandteil der EZM ist. Als Regulator des Terminalen Komplementweges verhindert Vitronektin die Bildung des TCC. Vitronektin wird als einzelkettiges Protein synthetisiert und existiert im Plasma in drei Formen: als einzelkettiges Molekül mit einem molekularen Gewicht von 75 kDa sowie als zwei verkürzte Formen mit jeweils einer Größe von 65 und 10 kDa. Die Bindung von Vitronektin an den C5b-7-Komplex verhindert die Insertion des Komplexes in die Zellmembran und schützt außerdem die pathogenen Mikroorganismen vor der Zellyse. Der Komplex bindet weiterhin C8 und C9, aber verhindert die Polymerisation von C9 und damit die lytische Funktion des TCC [84].

1.2.2.3. Die Zellen des angeborenen Immunsystems

Die Zellen des angeborenen Immunsystems besitzen die Aufgabe pathogene Mikroorganismen abzuwehren, die das Komplementsystem umgehen konnten. Vor allem Makrophagen und neutrophile Granulozyten greifen dabei auf verschiedenen Wegen die Mikroorganismen an und töten diese ab. Makrophagen und neutrophile Granulozyten phagozytieren die Mikroorganismen und attackieren diese intrazellulär mit antimikrobiellen Substanzen. Außerdem sezernieren die Zellen anti-mikrobielle Substanzen in den extrazellulären Raum und greifen dort die pathogenen Mikroorganismen an. Die Zellen produzieren zudem Entzündungsmediatoren, die chemotaktisch andere Abwehrzellen anlocken und sezernieren Zytokine, die die Zellen der spezifischen (adaptiven) Immunreaktion alarmieren bzw. in einen aktiven Zustand versetzen und somit eine spezifische Immunreaktion auslösen.

1.2.2.4. Die Phagozytose und die Zytokine

Makrophagen erkennen über spezifische Rezeptoren pathogene Mikroorganismen, die sie anschließend phagozytieren und intrazellulär über das Phagosomen abtöten. Verschiedenen Rezeptoren (PRRs) auf der Oberfläche von Makrophagen erkennen bakterienspezifische Moleküle (MAMPs) wie das Lipopolysaccharid (LPS) und die Lipoteichonsäure (LTA). Dazu gehören der LPS-Rezeptor (auch „cluster of differentiation“ genannt, CD14) und der Toll-like Rezeptor 4 (TLR4), die das LPS von Gram-negativen Bakterien erkennen. Der TLR2 erkennt dagegen das LTA Gram-positiver Bakterien. Des Weiteren gehören die Scavenger- Mannose und Glucan-Rezeptoren dazu, die an viele Zelloberflächenstrukturen binden. Durch Phagozytose nehmen die Zellen die Mikroorganismen in das Innere auf und schließen sie in einem Phagosom ein. Das Phagosom fusioniert mit dem Lysosom und das Innere wird durch Enzyme und reaktive Sauerstoff- und Stickstoff-Metabolite („reactive oxygen species“, ROS) angesäuert, was zur Verdauung und somit zum Auflösen der Mikroorganismen führt. Des Weiteren kommt es zur Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen, sowie zur Aktivierung von Neutrophilen, die an den Ort der Infektion einwandern.

Die Makrophagen präsentieren Peptidfragmente der verdauten Mikroorganismen über „major histocompatibility complex“ (MHC)-Moleküle. Dabei sind zwei Klassen zu unterscheiden: MHC-Klasse I und MHC-Klasse II. Über den Prozess der Exozytose werden Bruchstücke, der im Phagosom verdauten Mikroorganismen, über den Golgi-Apparat an die Oberfläche transportiert und den T-Zellen präsentiert. CD8⁺-Zellen erkennen das MHC-Klasse I-Molekül und CD4⁺-Zellen das MHC-Klasse II-Molekül. Die Bindung führt zu einer Aktivierung der Zellen (Abschnitt 1.2.3.1.). Aufgrund der Eigenschaft, Antigene an ihrer Oberfläche zu präsentieren, nennt man die Makrophagen auch Antigenpräsentierende Zellen (APZ). Auch B-Zellen (Abschnitt 1.2.3.2.) und dendritische Zellen besitzen die Eigenschaften von APZ.

Zytokine sind antigenunspezifische kleine Proteine, die verschiedene Zellen freisetzen und das Verhalten anderer beeinflussen bzw. auf sich selber wirken. Sie besitzen jedoch eine Funktionsspezifität und rufen entweder eine Zellteilung der Zielzelle (Wachstumsfaktor) hervor oder lösen eine bestimmte Funktion aus.

Das Interleukin-1 (IL-1) und der Tumornekrose-Faktor alpha (TNF-α) sind für das angeborene Immunsystem von besonderer Bedeutung. Das entzündungsmediatorische IL-1 wird von Makrophagen produziert und wirkt auf Endothelzellen. TNF-α ist ein weiterer Entzündungsmediator, das von Makrophagen freigesetzt wird und auf diese aktivierend

wirkt. Für die Makrophagenaktivierung sind außerdem IL-12, IL-18 und das Interferon gamma (INF- γ) von großer Bedeutung.

1.2.3. Das erworbene (adaptive) Immunsystem

Der menschliche Körper entwickelt gegenüber Infektionen durch eine spezifische Reaktion auf pathogene Mikroorganismen eine lebenslange Anpassung und bildet ein immunologisches Gedächtnis. Diese spezifische Immunantwort wird zum einen durch Antikörper erzeugt, die gegen ein bestimmtes Pathogen bzw. gegen ein pathogen spezifisches Antigen gerichtet sind. Zum anderen präsentieren APZ Bruchstücke der Mikroorganismen, die aktivierend auf Effektorzellen wirken. Außerdem sezernieren APZ Zytokine oder Chemokine und locken Zellen an, die eine spezifische Immunantwort hervorrufen. Dabei sind verschiedene immunologische Zelltypen beteiligt, wie Makrophagen, dendritische, neutrophile, eosinophile und basophile Zellen, Mastzellen, Lymphozyten und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen).

In dieser Arbeit wird nur auf die Lymphozyten genauer eingegangen. Die Lymphozyten sind in zwei Gruppen: T-Lymphozyten (T-Zellen) und B-Lymphozyten (B-Zellen), die separat betrachtet werden.

1.2.3.1. Die T-Lymphozyten

Die T-Lymphozyten (T-Zellen) stammen aus dem Knochenmark und reifen im Thymus, wo sie noch keine funktionale Aktivität besitzen. Reife T-Zellen zeichnen sich durch das Vorhandensein des membranständigen CD3-Moleküls aus. Das CD3-Molekül erkennt keine Antigene, sondern ist für die intrazelluläre Signaltransduktion zuständig. Für die Antigenerkennung produzieren T-Lymphozyten an ihrer Oberfläche einen antigenspezifischen membranständigen Rezeptor, den T-Zell-Rezeptor (TZR). Nur das Zusammenwirken des CD3-Moleküls und des TZR leitet eine Immunreaktion ein. Aufgrund weiterer Oberflächenmoleküle werden die T-Zellen in zwei Populationen unterteilt: die CD4⁺- (T-Helferzellen, TH) und die CD8⁺-Zellen (zytotoxische T-Zellen).

Die Aktivierung der CD4⁺-Zellen führt zu zwei verschiedenen T-Helferzellen und wird durch die Interleukine IL-12 (Aktivierung zu TH₁) und IL-4 (Aktivierung zu TH₂) vermittelt. Die T-Helferzellen unterscheiden sich in ihren Rezeptoren und ihrer Zytokinproduktion. Die TH₁ sind für die Reifung zytotoxischer T-Zellen durch die Expression von IL-2 und für die Aktivierung von Makrophagen durch INF- γ verantwortlich. TH₂ induziert die Differenzierung von B-Zellen. Der TZR der CD4⁺-Zellen erkennt Epitope, die von APZs

über MHC-Klasse II-Moleküle präsentiert werden. Neben der Antigenerkennung kommt es zusätzlich zur Kostimulation durch weitere Moleküle. Die $CD4^+$ -Zellen exprimieren das kostimulatorische Molekül CD28, der mit den Liganden CD80/CD86 auf APZ interagiert. Die regulatorische T-Zellen (T_{reg} -Zellen) sind eine besondere Population der $CD4^+$ -Zellen und unterdrücken die Funktion anderer T-Zellen. Die T_{reg} -Zellen sind durch das CD25-Molekül, der α -Kette des IL-2-Rezeptors und den Transkriptionsfaktor Foxp3, welches die Suppressor-Funktion ausübt, charakterisiert.

$CD8^+$ -Zellen werden wie die $CD4^+$ -Zellen durch zwei Signale aktiviert. Über den TZR erkennen sie Epitope von Antigenen, die über MHC-Klasse I-Moleküle präsentiert werden. Zusätzlich besitzen sie den CD28-Rezeptor, der das CD80/CD86-Molekül auf der gleichen APZ erkennt. Die $CD8^+$ -Zellen differenzieren zu zytotoxischen T-Zellen, die direkt die Zielzellen durch Apoptose lysieren. Die Apoptose kann dabei durch zwei Signale induziert werden: die Granzym- oder Fas-FasLigand- ($CD95/CD95L$)- vermittelte Apoptose.

1.2.3.2. Die B-Lymphozyten

B-Lymphozyten (B-Zellen) produzieren Immunglobuline (Ig) und tragen somit zur humoralen Immunität bei. Die B-Zelle entwickelt sich unspezifisch als Vorläuferzelle im Knochenmark. Die B-Zellen exprimieren an ihrer Oberfläche B-Zellrezeptoren (BZR), die freie Antigene erkennen. Die Antigenerkennung findet ohne MHC-Moleküle statt. Kommt es zum Zusammentreffen der ruhenden B-Zelle mit einem Antigen wie z.B. mit dem Zuckermolekül LPS, werden diese zur Produktion von Ig angeregt. Dabei differenziert ein ruhender B-Lymphozyt zu einer Plasmazelle und sezerniert zunächst Ig der Klasse IgM. Die B-Zelle ändert ihre Reaktion, wenn es neben dem Antigenkontakt zum Kontakt mit spezialisierten T-Zellen ($CD4^+$ -Zellen) kommt. Der Kontakt wird durch den TZR vermittelt und dem CD40L-Molekül, der das CD40-Molekül auf der B-Zelle erkennt. Durch die zusätzliche Ausschüttung von Signalstoffen wie z.B. IL-2 und IL-4 durch die T_H -Zellen, differenzieren die B-Zellen zu Plasmazellen und produzieren IgG oder werden Gedächtniszellen.

1.2.4. Das Zusammenspiel zwischen Komplement- und Blutgerinnungssystem

Verschiedene Forschungsarbeiten postulierten in den letzten Jahrzehnten, dass das Komplementsystem mit anderen Enzymkaskaden verknüpft ist. Dazu gehört das Blutgerinnungssystem, das Fibrinolytische System sowie das Kinin-System [85]. Die Ursache dafür liegt zum einen in der molekularen Evolution der Blutkaskadensysteme. Das Blutgerinnungssystem und das Komplementsystem stammen von einem gemeinsamen Abwehrsystem ab [86]. Das Zusammenspiel beider wichtigen Prozesse ist in einigen Arbeiten untersucht und veranschaulicht.

Thrombin ist das Schlüsselenzym des Blutgerinnungssystems und aktiviert direkt die Komplementproteine C3 und C5. Thrombin spaltet C3 und C5. Die dabei entstehenden Anaphylatoxine C3a und C5a sind chemotaktisch aktiv [87]. In einem C3-defizienten Serum wird durch Zugabe von Thrombin die C5-Konvertase gebildet. Es entsteht C5a und es kommt zur Bildung des TCC. Der Gerinnungsfaktor XIIa und Plasmin aktivieren C1q und leiten somit den klassische Weg ein [88, 89]. Im Gegenzug reguliert der C1-Inhibitor die Blutgerinnung und inhibiert Kallikrein und Faktor XIIa, Komponenten der Gerinnungskaskade [88].

Im Jahr 1953 ist erstmalig ein Zusammenhang der Serinprotease Plasmin mit dem Gerinnungssystem beschrieben. Plasminogen wird mit SK zu Plasmin aktiviert und Plasmin spaltet die Komplementproteine C1, C2, C3 und C4, was zu einer Inaktivierung des Komplementsystems führt [90]. Das C3 Spaltprodukt C3a ist biologisch aktiv und wirkt chemotaktisch [91]. Plasminogen bindet das C3-Aktivierungsfragment C3b sowie C5. Plasminogen wird durch den menschlichen Aktivator uPa zu Plasmin aktiviert und Plasmin spaltet das gebundene C3b sowie C5 in inaktive Fragmente. Damit besitzt Plasmin zwei Funktionen: (1) Aktivierung und (2) Inhibierung des Komplementsystems [**Manuskript 3**] [92]. Plasminogen bindet außerdem die terminalen Komplementproteine C7 und C9 und Plasmin beeinflusst die Stabilität des C567-Komplexes [91].

Zwischen dem Komplementsystem und der Fibrinolyse sind weitere Interaktionen bekannt. Die Stimulierung von Mastzellen mit C5a führt zur Ausschüttung des Plasminogenaktivator-Inhibitors PAI-1 [93]. Kallikrein spaltet Faktor B in Bb und Ba, wobei Bb anschließend das Plasminogen aktiviert [94]. In Polymorphkernigen Neutrophilen ist CR3, der Rezeptor für iC3b, physikalisch an den Urokinaserezeptor gekoppelt [95]. In der Literatur wird bereits die Aktivierung des Komplementsystems durch das Blutgerinnungssystem als vierter Weg postuliert (**Abbildung 7**) [87, 96].

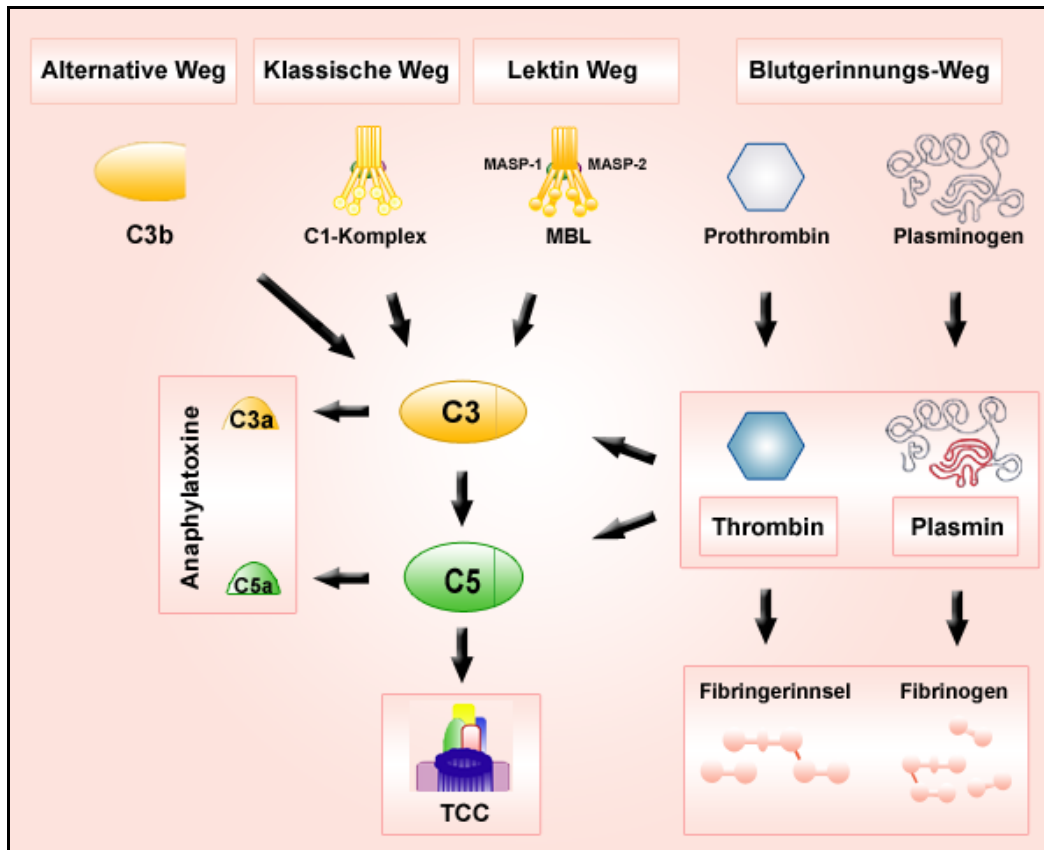


Abbildung 7: Die Aktivierung des Komplementsystems kann über einen vierten Weg erfolgen.

Das Blutgerinnungssystem steht in direkter Verbindung zum Komplementsystem. Thrombin aktiviert Fibrinogen zu Fibrin, das mit Blutplättchen Fibringerinnsel ausbildet. Im Gegenzug löst Plasmin die gebildeten Fibrinnetzwerke wieder auf. Zudem wird das Komplementsystem durch die Schlüsselenzyme der Blutgerinnung und der Fibrinolyse, Thrombin und Plasmin, aktiviert. Die beiden Enzyme spalten die zentralen Komplementproteine C3 und C5 in C3b und C5b, die im weiteren Verlauf der Kaskade den terminalen Komplex bilden (TCC). Die kleineren Spaltfragmente C3a und C5a sind chemotaktisch aktiv und wirken als Anaphylatoxine (Verändert nach [96]).

1.3. Die Immunevasion von pathogenen Mikroorganismen

In der vorliegenden Arbeit werden gezielt die Strategien der Immunevasion der Gram-negativen Bakterien *Haemophilus influenzae* und *Borrelia burgdorferi* untersucht. Gram-negative Bakterien unterscheiden sich von Gram-positiven Bakterien vor allem in ihrem Aufbau der Zellwand. Die Zellwand der Gram-negativen Bakterien besteht aus einer einschichtigen Peptidoglykanschicht, eine dünne Mureinschicht und dem Hauptmembranbestandteil LPS. Dagegen besteht die Zellwand Gram-positiver Bakterien aus einer mehrschichtigen Peptidoglykanschicht, einer dicken Mureinschicht und den Membranbestandteile Lipo- und Peptidoteichonsäure. Die Gram-negativen Bakterien *H. influenzae* und *B. burgdorferi* sind pathogene Mikroorganismen, bei denen immer häufiger Antibiotika-Resistenzen auftreten. Ich habe mir die Aufgabe gestellt, ein neues Angriffsziel zur Entwicklung neuer Therapeutika zu identifizieren.

1.3.1. *Haemophilus influenzae*

1.3.1.1. Die Taxonomie

Haemophilus gehört zu der Familie der *Pasteurellaceae*. Die Familie der *Pasteurellaceae* umfasst unbewegliche Gram-negative Stäbchen oder Kokken, die Oxidase- und Katalase-positiv sind, keine Sporen bilden und unter fakultativen anaeroben Bedingungen leben (**Abbildung 8**) [97]. Die *Pasteurellaceae* gewinnen Energie durch Fermentation unter anaeroben Bedingungen oder über den Atmungsprozess unter aeroben Bedingungen.

H. influenzae ist erstmalig im Jahr 1892 von Robert Pfeiffer in der Literatur beschrieben [98]. Der Name wurde aufgrund der Zugehörigkeit zum Influenza-Erreger vergeben, da erst im Jahr 1933 Wilson Smith zeigte, dass die Influenza durch einen Virus verursacht wird [99]. Der Name *Haemophilus* kommt aus dem griechischen von *haima* (Blut) und *philos* (Liebhaber) und weist auf dessen Vorliebe für Blutkomponenten hin. Diese Bakterienart besitzt Auxotrophien für die Wachstumsfaktoren Faktor X (protektische Gruppe Häm) und Faktor V (Nikotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat, NADP bzw. Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid, NAD). *H. influenzae* wird auf Kochblut- („Schokoladen“-) Agar, der mit Faktor X und mit Faktor V angereichert ist, kultiviert. Die optimalen Wachstumsbedingungen liegen bei 5 – 10 % CO₂ und einer Temperatur von 35 - 37°C [100].

Der Gattung *Haemophilus* gehören insgesamt 15 Spezies an, wobei elf im Menschen vorkommen. Neben *H. influenzae* sind *H. haemolyticus*, *H. parainfluenzae*, *H. parahaemolyticus*, *H. ducreyi*, *H. aphrophilus*, *H. paraphrophilus* und *H. segnis* die

bekanntesten Vertreter der Gattung *Haemophilus* [101]. Die Biotypisierung von *Haemophilus* erfolgt anhand von Lipooligosaccharid- und stammspezifischen Außenmembranprotein-Profilen [102, 103]. Außerdem unterscheidet man bekapselte von unbekapselten oder nicht-typisierbaren *H. influenzae* Unterarten (NTHi). Die bekapselten Formen unterteilt man wiederum in sechs Serotypen (a bis f), wobei der *H. influenzae* Serotyp b (Hib) zu den bedeutendsten Erregern gehört.



Abbildung 8: Rasterelektronisch-mikroskopische Aufnahme von *H. influenzae*.

Die stäbchenförmigen Bakterien adhären an Zellen der respiratorischen Mucosa. (Quelle der Abbildung: www.sciencephoto.com).

1.3.1.2. Die Pathogenese von *H. influenzae*

Bekapselte und unbekapselte Stämme von *H. influenzae* befinden sich vorwiegend auf der respiratorischen Mucosa von klinisch gesunden Trägern (bis zu 80 %). Die Übertragung erfolgt über Tröpfchen oder direkten Kontakt mit Trägern. *H. influenzae* ist ein kommensales Bakterium, d. h. es führt nicht dringend zum Krankheitsbild. Bei Ausbruch der Krankheit, beobachtet man zwei Erkrankungsformen: Oberflächeninfektionen und invasive systemische Erkrankungen. Kinder unter 10 Jahren sind dabei besonders betroffen. Der bekapselte Hib ist der Hauptverursacher von Pneumonie bei Kindern und ist für die Entstehung von eitriger Meningitis, Sepsis, Pneumonie und akuter Epiglottitis verantwortlich. Unbekapselte Stämme verursachen nicht-invasive Infektionen wie Otitis Media, Sinusitis und Bronchitis. NTHi lösen Oberflächeninfektionen aus und führen zu Otitis Media, Sinusitis, Epiglottitis, Pneumonie und Bakteriämie, sowie zu einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung [104]. NTHi ist nach *S. pneumoniae* der Hauptverursacher von Otitis Media bei Neugeborenen und Kindern [105].

1.3.1.3. Die Pathogenitätsfaktoren von *H. influenzae*

Eine erfolgreiche Infektion durch pathogene Mikroorganismen verläuft in vier klassischen Phasen: (1) Etablierung, (2) Adhäsion und Kolonisation, (3) Invasion und (4) Schädigung des Zielgewebes. Dabei verleihen verschiedene Virulenzfaktoren den pathogenen Mikroorganismen die Eigenschaft eine Infektion auszulösen. Die meisten bisher charakterisierten Virulenzfaktoren sind Zelloberflächenkomponente und zytosolische Proteine, die einen Schutz vor der menschlichen Immunabwehr z.B. durch Resistenz gegen Phagozytose vermitteln, bei der Adhäsion und Invasion von menschlichen Epithelzellen eine Rolle spielen, und entzündliche Reaktionen hervorrufen.

Die Überwindung der natürlichen Barrieren des menschlichen Organismus ist der Ausgangspunkt einer erfolgreichen Infektion durch pathogene Mikroorganismen. Eine Infektion von *H. influenzae* verläuft in den beschriebenen vier Phasen (**Abbildung 9**). Nach der Überwindung der natürlichen Barrieren etablieren sich die Bakterien und umgehen die angeborene Immunantwort. *H. influenzae* besitzt verschiedene Strategien das Immunsystem zu entkommen. Die Polysaccharidkapsel ist dabei der wichtigste Virulenzfaktor. Diese Kapsel ist ein dichtes Netzwerk aus sich wiederholenden Polyribose-Ribitol-Phosphat-(PRP)-Einheiten, die die gesamte Oberfläche von *H. influenzae* bedecken. Dabei wirkt sie antiphagozytotisch und führt zu einer höheren Blutserumresistenz [106]. Zum weiteren Schutz vor dem Immunsystem produzieren die bekapselten *Haemophilus*-Stämme IgA1-Proteasen. Das Immunglobulin IgA ist der vorherrschende Antikörpertyp auf der Mucosa und dient dazu, die Adhäsion von Mikroorganismen zu verhindern und die Phagoytose zu unterstützen. Die von *Haemophilus* produzierten IgA-Proteasen spalten die IgA-Antikörper in der „hinge region“ und führen zur Trennung des Fab- und eines Fc-Fragmentes des IgAs [107]. Außerdem bindet *H. influenzae* Komplementregulatoren wie Faktor H, FHL-1, Vitronektin und Plasminogen. Die gebundenen Komplementregulatoren sind funktionell und vermitteln den Bakterien eine Strategie zur Abwehr des Komplementsystems [108-110]. Das Protein Protein E (PE) bindet die Komplementregulatoren Plasminogen und Vitronektin (Abschnitt 1.3.1.6.). Das gebundene Plasminogen wird durch menschliche Aktivator zu Plasmin aktiviert, was zu einer Spaltung der Komplementproteine C3b und C5 führt und somit die Komplementkaskade inhibiert [**Manuskript 1 und 3**]. Die Rezeptoren für Faktor H und FHL-1 sind nicht bekannt.

Nach einer erfolgreichen Etablierung heftet sich *H. influenzae* am Zielgewebe an und persistiert auf der respiratorischen Mucosa. Dafür sind spezifische Wechselwirkungen zwischen Adhäsinen der Bakterien und Rezeptoren auf den Wirtzellen nötig. Adhäsine sind Proteine, die eine Anheftung bzw. Adhäsion vermitteln. Zu den Adhäsinen von

H. influenzae gehören Fimbrien (Pili), die eine helikale Struktur mit einer Länge von bis zu 405 nm besitzen und den Bakterien die Adhäsion an den oberen respiratorischen Trakt und bronchialen Zellen ermöglichen. Bei unbekapselten Stämmen sind Fimbrien durchweg an der Oberfläche zu finden, aber nur wenige NTHi-Stämme exprimieren Fimbrien, die eine Bindung von NTHi an Erythrozyten und an den respiratorischen Trakt vermitteln [111]. Fimbrien, die von Hib exprimiert werden, interagieren mit EZM-Proteinen, wie Fibronektin. Nach der Kolonisierung von *H. influenzae* geht die Expression von Fimbrien verloren [112].

Weitere für die Kolonisierung benötigte Adhäsine, wie die hochmolekularen Rezeptorproteine 1 und 2 („*high molecular weight protein*“, HMW1/2) sind in der Außenmembran von *H. influenzae* verankert. Diese Rezeptorproteine binden an pharyngale Zellen und an Makrophagen. Dabei zeigt HMW1 eine höhere Bindungsspezifität für pharyngale Zellen, während HMW2 mit höherer Affinität an Zellen des Genitaltraktes adhäriert [113]. Beide Proteine sind Mitglieder der Autotransporterfamilie [114].

Das Hauptadhäsin von Hib ist das 245 kDa große „*Haemophilus surface fibril*“ Protein (Hsf), dessen Gen hoch konserviert in *H. influenzae* vorliegt. Es besitzt drei homologe Domänen mit einer hohen Sequenzhomologie und zeigt eine kurze, dünne fibrillenartige Struktur an der Oberfläche von *H. influenzae* und vermittelt die Adhärenz an Epithelzellen. Hsf ist ebenfalls ein Autotransporter, der sekretiert wird und zudem gebunden an der Oberfläche von *H. influenzae* zu finden ist [115]. Das „*H. influenzae adhesin*“ (Hia) ist ein Homolog zum Hsf und ist in ca. 25 % in unbekapselten Stämmen vorhanden [116]. Hsf und Hia sind Liganden für den gleichen Rezeptor an Epithelzellen. Auch Hia gehört zu der Autotransporter-Familie, jedoch wird Hia nicht am C-Terminus gespalten und ist somit nur Zell-assoziiert [117]. Das Adhäsion Hap („*Haemophilus adhesion and penetration protein*“) wird von NTHi und Hib exprimiert und ist ein weiteres 155 kDa großes Autotransporterprotein mit einer Homologie zur IgA-Protease [118]. Hap vermittelt die Adhäsion durch die Bindung an EZM-Proteinen [119]. Das Protein PE vermittelt ebenfalls die Adhäsion zur respiratorischen Mucosa (Abschnitt 1.3.1.6.).

Nach der Adhäsion und Kolonisierung dringen die Bakterien in das Gewebe ein, wozu sie Invasine benötigen. Invasine sind Proteine, die eine Anheftung und das Eindringen von Mikroorganismen in das Zielgewebe vermitteln. Die äußere Membran von Gram-negativen Bakterien ist mit eingelagerten LPS assoziiert. Das LPS besteht aus einem toxischen Lipid A, einem Kern-Oligosaccharid und einem variablen Polysaccharidanteil, dem O-Antigen.

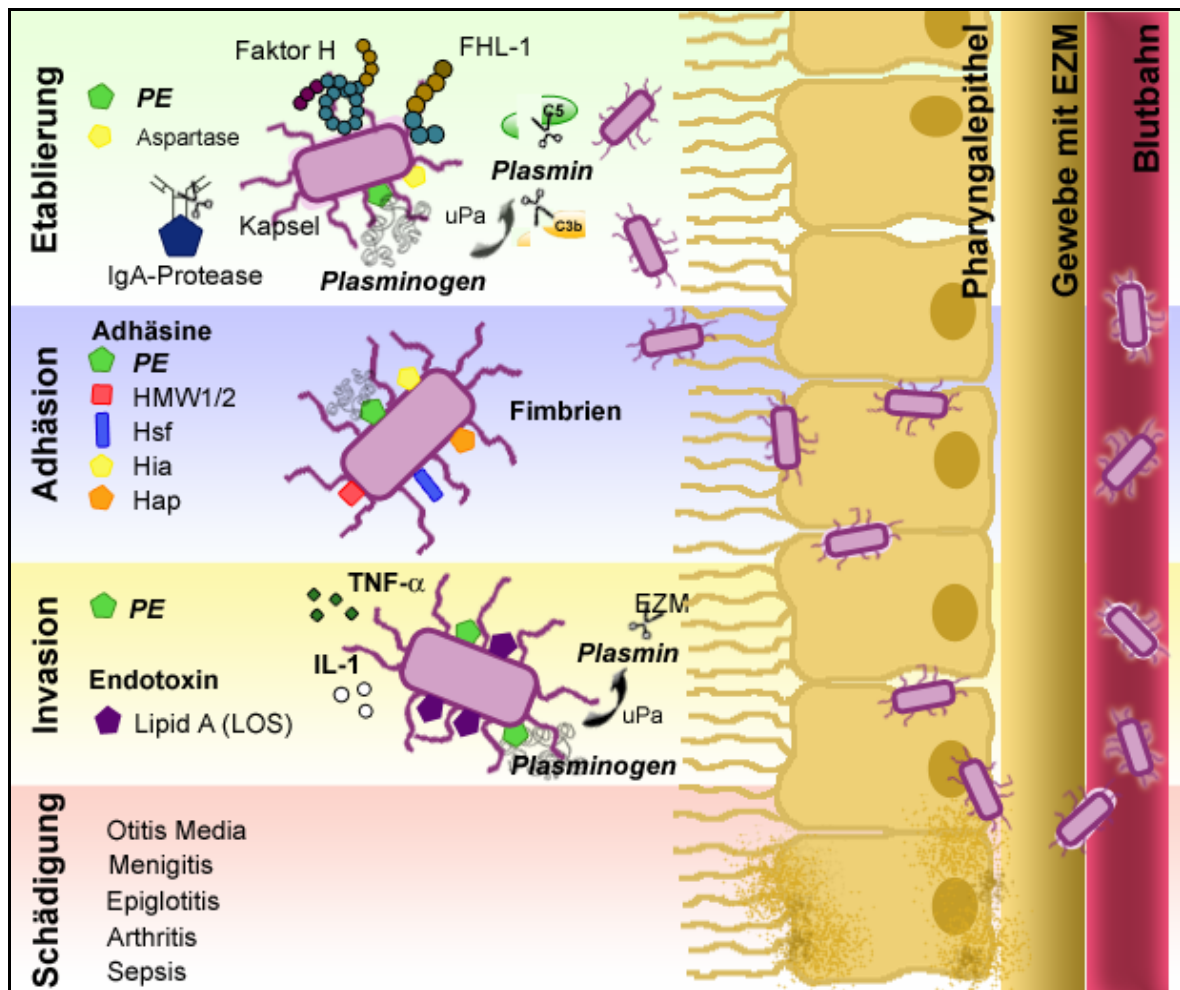


Abbildung 9: Die Infektion von *H. influenzae* verläuft in vier klassischen Phasen.

Nach der Übertragung von *H. influenzae* etablieren sich die Bakterien im menschlichen Organismus und umgehen das Immunsystem. Die Bakterien schützen sich durch eine Polysaccharid-Kapsel und sezernieren IgA-Proteasen, die Antikörper degradieren. Sie rekrutieren Komplementregulatoren, wie Faktor H, FHL-1, Vitronectin und Plasminogen an ihrer Oberfläche und regulieren das Komplementsystem. Gleichzeitig adhären die Bakterien an den Zellen der respiratorischen Mucosa über Fimbrien und über Adhäsionsproteine, wie PE, HMW1/2, Hsf, Hia, und Hap. Anschließend dringen sie in das Gewebe ein, wobei die Bakterien durch die Bindung von Plasminogen, das durch uPa zu Plasmin aktiviert wurde, Proteine der EZM degradieren. Außerdem löst die Freisetzung des Endotoxins Lipid A eine Entzündungsreaktion aus, die Zellen zerstört. Über die Blutbahn gelangen sie zum Zielort, wo sie den menschlichen Organismus schädigen.

Im Gegensatz zum LPS der Gram-negativen Bakterien produziert *H. influenzae* das Lipooligosaccharid (LOS), welches nur kurze O-Seitenketten besitzt [120]. Das LOS ist in seiner Zusammensetzung hoch variabel und wird durch Umwelteinflüsse reguliert [121]. Das Lipid A des freien LOS bindet an CD14 und TLR-4 von Makrophagen und B-Zellen, die dadurch zur Produktion von Akuten-Phase-Zytokinen, wie IL-1, TNF-α, IL-6 und Prostaglandine stimuliert werden. Dies führt zu Entzündungsreaktionen und die Zellen verlieren ihre Stabilität, sodass die Bakterien weiter in das Gewebe eindringen. Die Bakterien entlassen das LOS in die Umgebung, wo es effektiver ist als im

membrangebundenen Zustand. Das LOS spielt somit eine große Rolle bei der Pathogenität und ist damit das Hauptimmunogen von NTHi bei Otitis Media [122].

Die Außenmembran von *H. influenzae* besteht weiterhin aus sechs Hauptproteinen, P1 bis P6. P2 ist hoch variabel in seiner Struktur und schützt die Bakterien vor der Erkennung durch Antikörper. P2 ist zudem ein Porin und spielt eine wichtige Rolle bei der Infektion. P5 ist ebenfalls ein wichtiges Außenmembranprotein und gilt als Adhäsion. Ein weiterer wichtiger Bestandteil der Membran ist das Protein D und wird im Abschnitt 1.3.1.4. genauer beschrieben.

H. influenzae gibt während des Wachstums „outer membrane vesicles“ (OMVs) in die Umgebung ab. Auch bei anderen Gram-negativen Bakterien, wie *Proteus mirabilis*, *N. gonorrhoeae*, *P. aeruginosa* und *Moraxella catarrhalis* beobachtet man dieses Phänomen. Im Periplasma dieser OMVs sind Proteine der Äußeren Membran, Porine, Rezeptoren und LPS. Diese Proteine sind biologisch aktiv [123-125].

1.3.1.4. Die Vakzine gegen *H. influenzae*

Im Jahr 2006 starben weltweit zwei Millionen Kinder an Pneumonie, darunter sind 1/5 unter fünf Jahre. In den 70igern führte man den ersten Impfstoff gegen Hib ein, der gegen das Kapsel-Polysaccharid (PRP der Äußeren Membran) gerichtet ist. Später in den 80igern entwickelte man einen weiteren Impfstoff gegen Hib, ein Konjugat-Vakzin gegen das PRP gekoppelt an ein Carrierprotein. Diese erzielen eine verstärkte Immunantwort. Das erste Konjugat-Vakzin ist eine Konjugation aus PRP und dem Diphteritoxin (PRP-D). Es folgten drei weitere Konjugat-Vakzine, wobei das Carrierprotein entweder aus einem mutierten Diphteritoxin (PRP-CRM₁₉₇), aus einem Meningokokken „outer membrane protein“ (PRP-OMP) oder aus einem Tetanustoxin (PRP-T) bestand [126]. Bisher ist gegen den nicht-typisierbaren *H. influenzae* Stamm kein Impfstoff gefunden.

Das Lipoprotein Protein D (PD) gilt als Kandidat für eine Immunisierung gegen NTHi. Das 42 kDa große PD ist ein hoch konserviertes Oberflächenprotein im bekapselten sowie im unbekapselten Typ von *H. influenzae*. Die Sequenz von PD besitzt eine Homologie von ca. >97 % auf Nuklotid- und Aminosäure-Ebene [127]. Diese Aspekte machen PD zu einem attraktiven Vakzinkandidaten. Versuche an Chinchillas zeigten, dass PD als erfolgsversprechendes Vakzin gilt, da die Tiere nach der Immunisierung vor einer akuten Otitis Media geschützt waren [128]. Der Einsatz eines PD-Konjugates mit pneumokokken Kapselpolysaccharid in einer stichprobenartigen Doppel-Blindstudie zeigte ebenfalls einen potentiellen Schutz bei Kindern gegen eine akute Otitis Media, verursacht von Pneumokokken bzw. *H. influenzae* [129]. Auch bei weiteren Tierversuchen z.B. mit Ratten

beobachte man zum einen eine bessere Überlebensrate und zum anderen eine gesteigerte Beseitigung von NTHi in der Lunge [130, 131].

1.3.1.5. Die Antibiotikaresistenzen von *H. influenzae*

Das Auftreten von Antibiotikaresistenzen von *H. influenzae* hat in den letzten Jahrzehnten stetig zugenommen und zeigt enorme geographische Unterschiede. In der Bundesrepublik Deutschland beobachtet man bei ca. 5 % der Isolate Resistenzen gegen Ampicillin. Für *H. influenzae* sind verschiedene Resistenzmechanismen bekannt und untersucht: (1) die Produktion von β -Lactamasen zur Inaktivierung der β -Lactam-Antibiotika, (2) die Modifikation von Penicillinbindende Proteinen (PBP) mit geringer Affinität für β -Lactam-Antibiotika und (3) das Fehlen des Außenmembranproteins für die Aufnahme von β -Lactam-Antibiotika.

Zu den β -Lactam-Antibiotika (β -Lactame) gehören die Antibiotika Ampicillin und Amoxillin, die bei der Behandlung gegen *H. influenzae* eingesetzt werden. Die β -Lactame werden in vier Wirkstoffklassen eingeteilt: Penizilline, Cephalosporine, Monobactame und Carbapeneme. Sie wirken im Extrazellularraum und beeinträchtigen die Zellwandsynthese von Bakterien indem sie die Mureinsynthese inhibieren. Die Mureinsynthese, auch PBP genannt, sitzt an der Oberfläche der Zytoplasmamembran von Bakterien und vernetzt als Transpeptidase die Glykanstränge durch Peptidbrücken zu Peptidoglykanen (Murein). Die PBP besitzen einen β -Lactam-Ring, der von den β -Lactamen erkannt wird und somit die Aktivität der PBP blockiert. *H. influenzae* reichern den periplasmatischen Raum mit β -Lactamasen an, die den β -Lactam-Ring der β -Lactame spalten und somit die Aktivität der β -Lactame inhibieren. *H. influenzae* besitzt zwei Gene für die β -Lactamase: *bla*_{TEM} (TEM-Typ β -Lactamase) und *bla*_{ROB-1} (ROB-1 β -Lactamase). Beide sind Plasmid-Vermittelte Enzyme. Durch die Zunahme der β -Lactame-Resistenz der wird der Einsatz von 3. Generations-Cephalosporinen notwendig [132].

Ein weiterer Resistenzmechanismus ist die Modifikation der PBP. *H. influenzae* besitzt insgesamt acht PBP (PBP1 – 8), die durch einzelne Aminosäuren-Substitutionen ihre Affinität zu β -Lactamen verlieren. Der dritte Resistenzmechanismus ist das Fehlen der AcrAB-Efflux-Pumpe. Diese Efflux-Pumpe vermittelt die Aufnahme von Carbapenemen, aber auch von Macroliden. Durch eine Repression der Expression der AcrAB-Efflux-Pumpe ist die Aufnahme der Antibiotika vermindert [132].

1.3.1.6. Das Adhäsionsprotein Protein E (PE)

Das Protein Protein E (PE) ist ein Oberflächenprotein mit einer molekularen Masse von 16 kDa, das konstitutiv an der Oberfläche von NTHi exprimiert wird [133]. Das *pe* Gen liegt hoch konserviert im Genom der Familie der *Pasteurellaceae* vor. PE ist ein Adhäsionsprotein und vermittelt die Anheftung von *H. influenzae* an die Epithelzellen der respiratorischen Mucosa (**Abbildung 9**). Eine *pe*-defiziente NTHi-Mutante zeigt im Vergleich zum Wildtyp eine reduzierte Adhärenz zu Epithelzelllinien. Auch ein PE-exprimierender *E. coli*-Stamm erlangt die Möglichkeit zur Adhärenz. Die aktive Bindedomäne von PE an Epithelzellen liegt zwischen den Aminosäuren 84-108, im zentralen Molekül von PE [134].

PE immunisierte Mäuse zeigen eine geringere Anzahl von NTHi in der Lunge im Vergleich zu Mäusen, die mit einem Kontrollopeptid immunisiert wurden [135]. Außerdem induziert PE eine proinflammatorische Antwort. Eine erhöhte IL-8 Sekretion und eine Hochregulation von ICAM-1 (CD54) führte zu einer Verstärkung der Adhärenz von Neutrophilen an die Epithelzellen [135]. Weiterhin bindet PE die Plasmaproteine Plasminogen [**Manuskript 1**] und Vitronektin, ein EZM-Protein und Regulator des terminalen Komplementweges (**Abbildung 10**) [108]. Die Bindung von Plasminogen und Vitronektin ermöglicht *Haemophilus* die erste Barriere des Immunsystems zu umgehen und anschließend an die ECM von Epithelzellen zu adhären. Die Bindung von Plasminogen verleiht *H. influenzae* eine Strategie zur Abwehr des angeborenen Immunsystems durch die Spaltung von C3b und C5 und damit den Eingriff in einen frühen Verlauf des Komplementweges, sowie die Adhärenz an die EZM durch die Bindung an verschiedene EZM-Proteine [**Manuskript 1 und 3**]. Die Bindung von Vitronektin verleiht NTHi eine Serumresistenz durch die Regulation des terminalen Komplementweges und ebenfalls die Adhärenz an die EZM [108].

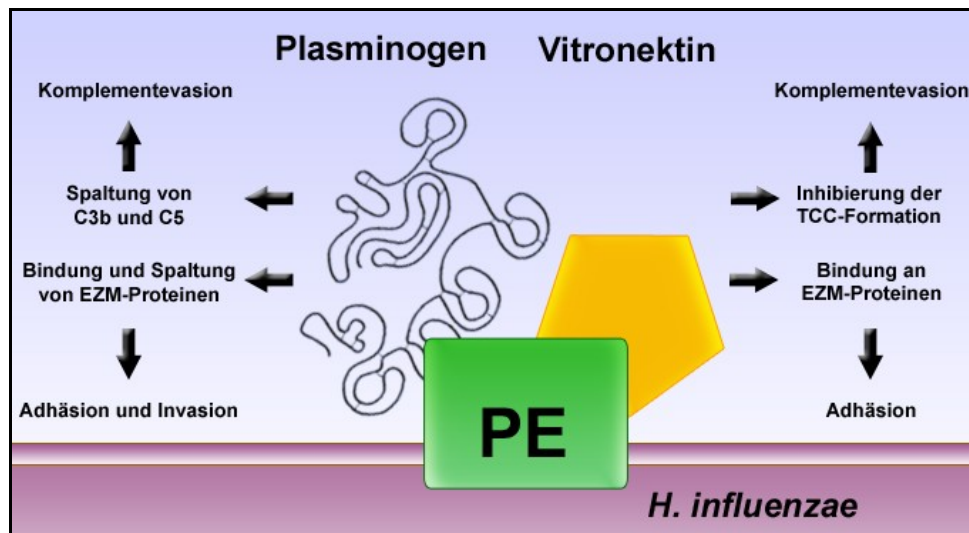


Abbildung 10: Das Adhäsionsprotein PE von *H. influenzae*.

PE ist ein multifunktionales Protein und bindet Plasminogen und Vitronektin. Das gebundene Plasminogen wird durch menschliche Plasminogenaktivatoren zu Plasmin aktiviert und spaltet die Komplementproteine C3b und C5, das zur Inhibierung der Komplementkaskade führt. Vitronektin ist ein Komplementregulator des terminalen Weges und verhindert die Lyse der Bakterien. Gebundenes Plasminogen und Vitronektin vermitteln außerdem die Adhäsion zur EZM der respiratorischen Mucosa.

1.3.2. *Borrelia burgdorferi*

1.3.2.1. Die Taxonomie

Die Gattung *Borrelia* gehört zu der Familie der *Spirochaetaceae* und gliedert sich in die Erreger des Rückfallfiebers (*B. recurrentis*, *B. duttoni* und *B. hermsii*) und der Lyme-Borreliose (*B. burgdorferi*-Komplex mit *B. burgdorferi*, *B. garinii*, *B. afzelii* und *B. spielmani* und *B. burgdorferi sensu lato*) [136]. Ihren Namen erhielt die Gattung *Borrelia* im Jahr 1982 nach dem französischen Mikrobiologen A. Borrel und ihre Speziesbezeichnung *Borrelia burgdorferi* nach Willy Burgdorferi [137]. Die Familie der *Spirochaetaceae* umfasst Gram-negative, spiralförmig gewundene Bakterien, die an obligat parasitische Bedingungen angepasst sind. Die Spirochäten zeichnen sich durch ihre Gestalt und Beweglichkeit aus (**Abbildung 11**). Sie besitzen helikale Filamente (Endoflagellen), die am Zellpol verankert sind. Diese winden sich im periplasmatischen Raum zwischen dem Zytoplasmamembran-Zellwand Komplex und der äußeren Membran um den Zellzylinder. Die Rotation der Endoflagellen und die damit verbundene Induzierung der Veränderung in der Zellmorphologie vermittelt diese Beweglichkeit.

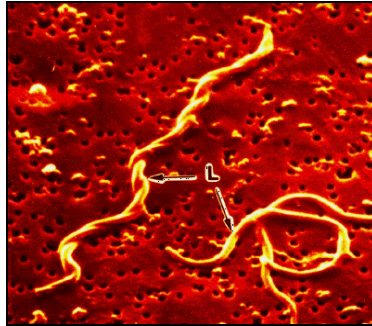


Abbildung 11: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Spirochäten der Borrelien-Art *B. burgdorferi*.

B. burgdorferi zeichnet sich durch ihre flexible, schraubenförmige Gestalt aus. (Quelle der Abbildung: www.wadsworth.org).

Borrelien besitzen wenige Gene mit biosynthetischer Aktivität und sind daher im Nährstoffbedarf stark vom Wirtsorganismus abhängig. Wie die meisten pathogenen Mikroorganismen besitzen die Spirochäten keine weiteren Proteaseaktivitäten an ihrer Oberfläche und sind daher auf menschliche Proteasen für ihre Verbreitung angewiesen [35].

1.3.2.2. Die Pathogenese von *B. burgdorferi*

Die Lyme-Borreliose ist die häufigste durch Zecken übertragende Zoonose in Europa und Nordamerika. In Deutschland werden bis zu 60.000 Neuerkrankungen pro Jahr gemeldet [136]. *B. burgdorferi* ist der Hauptverursacher der Lyme-Borreliose und wird durch den Biss der Schildzecke *Ixodes ricinus* verursacht. Dabei gelangen die Borrelien in den Blutkreislauf des Menschen. Unbehandelt erreichen die Mikroorganismen über den Blutkreislauf unterschiedliche Organe und lösen dort eine Infektion aus. Diese Infektion ist eine Multisystem-Erkrankung und verläuft in drei Stadien [138]. Die Zecken nehmen bei einer Blutmahlzeit die Borrelien auf. Bei einer erneuten Blutmahlzeit werden die Borrelien aus dem Mitteldarm über die Hämolymphe in die Speicheldrüse der Zecke und darüber in den menschlichen Organismus injiziert. Im Ersten Stadium (Frühstadium) vermehren sich die Borrelien und um die Stelle des Zeckenbisses entsteht ein Erythem migrans („bull’s-eye-shaped rash“), das sich zentrifugal ausbreitet. Im Zweiten Stadium, meist Wochen bis Monate nach der Infektion, kommt es zur Verbreitung der Borrelien über den Blutkreislauf ins Gewebe. Bei einer weiterführenden Infektion passieren die Borrelien die Blut-Hirn-Schranke und infizieren das Zentrale Nervensystem. Dieses Stadium ist einhergehend mit Arthritis, Myokarditis, Lymphadenopathien, sowie neurologischen Symptomen, sowie der Akrodermatitis chronica atrophicans. Im Dritten Stadium kommt es zu rezidivierenden Arthritiden („Lyme-Arthritis“), die 10-15 Jahre andauern [139].

1.3.2.3. Die Pathogenitätsfaktoren von *B. burgdorferi*

Nach der Injektion der Borrelien durch den Biss einer Schildzecke und der Überwindung der natürlichen Barrieren des menschlichen Organismus verläuft die Infektion wie bei *H. influenzae* in vier Phasen. Dabei spielen verschiedene Virulenzfaktoren eine Rolle (**Abbildung 12**). Die meisten Virulenzfaktoren sind auf Plasmiden codiert, wovon insgesamt 12 lineare sowie neun zirkuläre Plasmide vorhanden sind, die 40 % des DNA Gehaltes ausmachen [140]. Die Borrelien besitzen mehrere Strategien zur Abwehr des Immunsystems [141]. Einige Spezies der *Borrelia* exprimieren „complement regulator-acquiring surface proteins“ (CRASPs), die Komplementregulatoren wie Faktor H, FHL-1 oder CFHR1 binden und so das Komplementsystem an unterschiedlichen Stellen inhibieren [142, 143]. Die CRASP-Proteine -1 bis -5 binden außerdem Plasminogen, das zu Plasmin aktiviert wird und ebenfalls eine Inhibierung der Komplementkaskade bewirkt [**Manuskript 2 und 3**] [144, 145]. Eine Reihe weiterer Proteine sind für verschiedene *Borrelia*-Stämme für die Bindung von Komplementregulatoren beschrieben und untersucht, z.B. das „human complement and plasminogen binding protein“ A (HcpA) von *B. recurrentis* [36]. Die Borrelien besitzen die Fähigkeit Epitope innerhalb ihrer Oberflächenproteine zu verändern und weichen somit der spezifischen Immunabwehr aus (Antigenvariation). Das Lipoprotein VlsE ist ein typisches Beispiel für eine solche Antigenvariation [146]. Auch durch das herunter regulieren der Expression von Oberflächenproteinen, wie z.B. des OspC, als Antwort auf die Bildung spezifischer Antikörper ist eine effektive Strategie der Antikörperbildung zu entgehen [147, 148].

Zur Ausbreitung lagern sich die Borrelien an Endothelzellen oder an das Kollagen des Bindegewebes an. Dies erfolgt über die Adhäsionsproteine P66 und die „decorin-binding proteins“ A und B (DbpA, DbpB) [149]. *Borrelia* besitzt eine eher labile äußere Membran, die kein LPS enthält. Die äußere Membran wird durch Lipoproteine, den „outer surface proteins“ (Osp) A-F aufrechterhalten [150]. *Borrelia* bindet Plasminogen über das Lipoprotein OspA, so dass das gebundene Plasminogen die Adhärenz zu verschiedenen EZM-Komponenten vermittelt [43].

Zur Invasion in das Gewebe nutzen die Borrelien ebenfalls das gebundene Plasminogen. Das Zymogen wird durch menschliche Plasminogenaktivatoren zur Protease Plasmin aktiviert, welches Komponente der EZM wie Fibrinogen, Fibronectin, Laminin und Vitronectin degradiert und eine Migration in das Gewebe ermöglicht [43, 151]. Außerdem induziert *B. burgdorferi* die Freisetzung der Matrixmetalloproteinasen MMP-9 und MMP-1, die von Plasmin aktiviert werden und ermöglicht damit eine zusätzliche Degradierung der Basalen Membran [152].

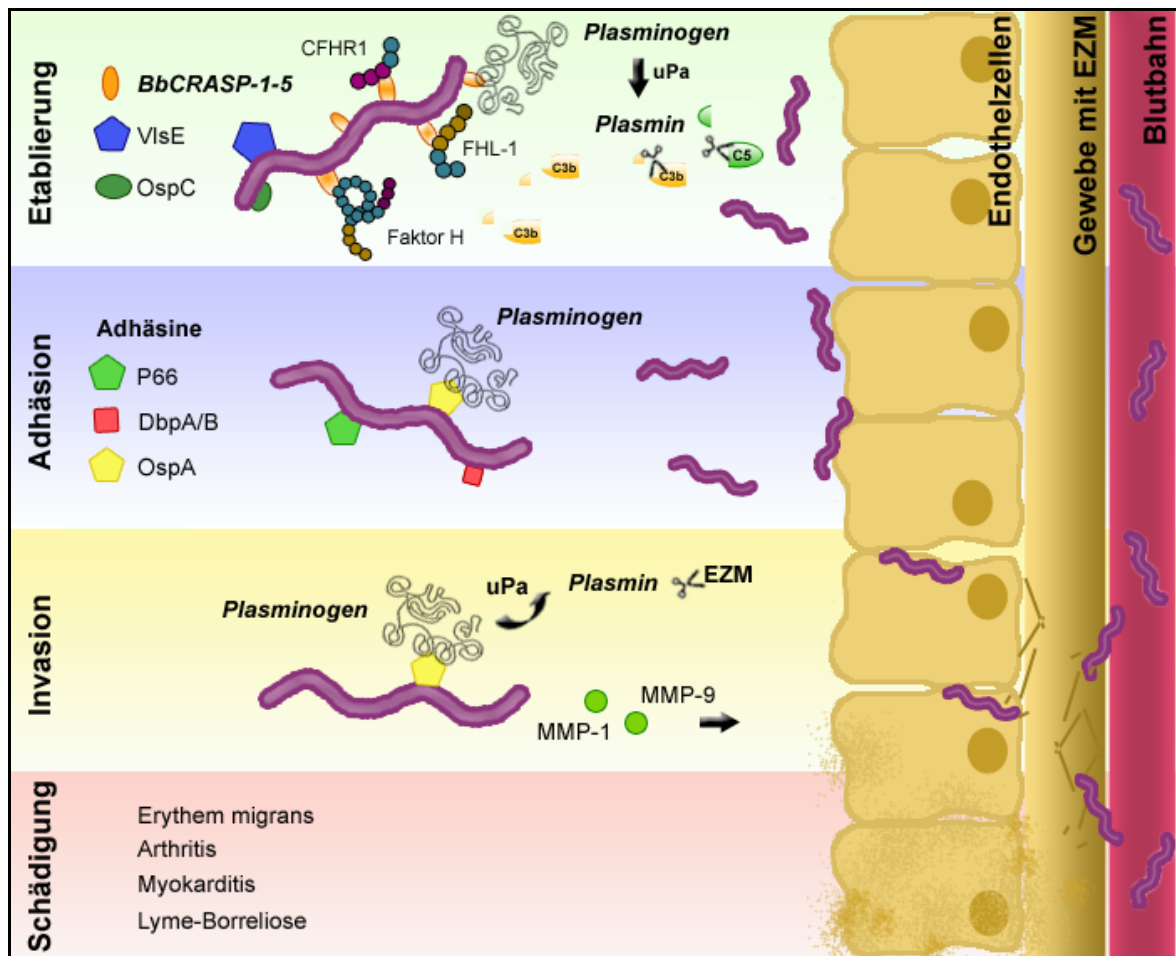


Abbildung 12: Die Infektion von *B. burgdorferi* verläuft in vier Phasen.

Nach der Injektion der Borrelien durch die Zecke, umgehen die Bakterien durch verschiedene Mechanismen das Immunsystem. Die Oberflächenproteine CRASP-1 bis -5 binden Komplementregulatoren, wie Faktor H, FHL-1, CFHR1 und Plasminogen, die die Komplementkaskade inhibieren. Zur Antigenvariation dienen die Lipoproteine *VlsE* und *OspC*. Gleichzeitig adhären die Borrelien über verschiedene Adhäsionsproteine, wie *P66* und *DbpA/B* an Endothelzellen. *OspA* bindet Plasminogen, was die Adhäsion zur EZM vermittelt. Nach erfolgreicher Adhäsion dringen sie in das Gewebe ein und gelangen in den Blutkreislauf. Das gebundene Plasminogen wird durch uPa zu Plasmin aktiviert und degradiert die Proteine der EZM. Außerdem lösen Matrixmetalloproteinasen (MMP) Entzündungsreaktionen aus, die das Zielgewebe zerstören. Von dort erreichen die Bakterien die Zielorgane und schädigen den menschlichen Organismus.

1.3.2.4. Vakzine und Antibiotikaresistenzen von *B. burgdorferi*

Zur Behandlung von Borreliose verwendet man in Deutschland und in Amerika Antibiotika, wie Doxzyklin, Amoxicillin und Azithromycin. Aufgrund aufkommender Antibiotikaresistenzen sowie zur Prävention der Borreliose trieb man die Entwicklung von Impfstoffen voran. Dabei wurden zwei Strategien betrachtet: die Erreger-Antigen-basierten und die Wirt-basierten Vakzine. Für die Erreger-Antigen-basierten Vakzine untersuchte man verschiedene Genprodukte der Zecke als potentielle Angriffsziele. Diese sind jedoch noch in der Entwicklung [153]. In den frühen 90igern kamen die Außenmembranproteine *OspA* und *OspB* als erstes Wirt-basiertes Vakzin auf den Markt.

Dabei waren zwei verschiedene Vakzine mit dem Immunogen OspA in Tiermodellen erfolgreich [154]. Das rekombinante OspA Vakzin blockierte die Transmission der Spirochäten vom Vektor zum Wirt. Aufgrund der verschiedenen *Borrelia* Genotypen in Europa ist ein monovalentes Vakzin nicht vorhanden. Außerdem erschweren die vielen verschiedenen Mechanismen der Antigenvariation, Immunevasion, Komplementresistenz und der laterale Gentransfer die Entwicklung eines Langzeitschutzes [138].

1.3.2.5. Die CRASP-Proteine von *B. burgdorferi*

Serum-resistente *Borrelia*-Spezies exprimieren so genannte CRASP-Proteine, die durch ihre jeweilige Bindung an Komplementregulatoren charakterisiert sind. Die Anzahl der exprimierten CRASP-Proteine unterscheidet sich je nach Spezies. *B. burgdorferi* und *B. afzelii* exprimieren je fünf CRASP-Proteine und sind je nach ihrer Spezies, als BbCRASP-1 bis BbCRASP-5 bzw. BaCRASP-1 bis BaCRASP-5 bezeichnet. Diese CRASP-Proteine sind in zwei Gruppen gegliedert und werden nach ihrer Bindung von Faktor H, FHL-1 oder CFHR1 den Gruppen zugeteilt (**Tabelle 3**).

Die Expression der CRASP-Proteine ist abhängig vom Infektionsstadium. Während der Transmission der Spirochäten von der Zecke auf den Menschen wird das BbCRASP-1 und während der Etablierung das BbCRASP-2 exprimiert [157, 158]. BbCRASP-1 und BbCRASP-2 gehören zur Gruppe I, die Faktor H und FHL-1 binden [142, 159].

Die Außenmembranproteine BbCRASP-3 (ErpP), BbCRASP-4 (ErpC) und BbCRASP-5 (ErpA) gehören zu der Erp-Familie und zur Gruppe II [35, 160]. Die Proteinfamilie wird während einer Infektion im Menschen in allen Stadien der Infektion exprimiert und sind somit stark angereichert [157, 158]. Nur wenige der Proteine der Erp-Familie sind bereits untersucht. Bekannt ist, dass die Proteine der Erp-Familie Oberflächenproteine sind [35] und für die Pathogenese der Borrelien eine große Rolle spielen. Für das ErpX ist zusätzlich eine Bindung für Faktor H und Laminin gezeigt [35, 161]. Die Erp Proteine ErpP, ErpC und ErpA sind zu 98 % homolog und besitzen eine Größe von ca. 19-21 kDa [35]. Die Proteine ErpP, ErpC und ErpA binden die Komplementregulatoren Faktor H und CFHR1 (Gruppe II) und sind damit für die Immunevasion verantwortlich (**Abbildung 13**) [156, 162]. Diese Proteine binden außerdem Plasminogen und vermitteln den Borrelien eine Strategie bei der Gewebsinvasion sowie bei der Immunevasion [**Manuskript 2**].

Tabelle 3: Bindeeigenschaften der CRASP-Proteine verschiedener *Borrelia*-Arten.

Eine Bindung der verschiedenen CRASP-Proteine zu den untersuchten Plasmaproteinen wird mit einem „+“ dargestellt. Keine Bindung bzw. eine nicht vorhandene Studie sind mit „-“ bzw. „?“ gekennzeichnet. Die CRASP-Proteine sind aufgrund ihrer Bindung zu Komplementregulatoren in zwei Gruppen eingeteilt oder gehören keiner von beiden Gruppen an. Die Grau hinterlegten Felder wurden in dieser Arbeit beschrieben.

	Bakterielles Protein	Plasminogen	Faktor H	CFHR1	FHL-1	Literatur
	<i>B. burgdorferi</i>					
Gruppe I	BbCRASP-1	+	+	-	+	[155]
	BbCRASP-2	?	+	-	+	
Gruppe II	BbCRASP-3 (ErpP)	+	+	+	-	diese Arbeit [156]
	BbCRASP-4 (ErpC)	+	+	+	-	
	BbCRASP-5 (ErpA)	+	+	+	-	
	<i>B. afzelii</i>					
Gruppe II	BaCRASP-1	?	+	-	+	[142, 143]
	BaCRASP-2	?	+	-	+	
	BaCRASP-3	?	-	-	+	[142, 143]
	BaCRASP-4	?	+	-	-	[142, 143]
	BaCRASP-5	?	+	-	-	
	<i>B. spielmanii</i> (BsCRASP-3)					
Gruppe I	Erp60	?	+	+	-	[45]
	Erp61	?	+	+	-	
	Erp62	?	+	+	-	
	Erp63	+	-	-	-	[45]

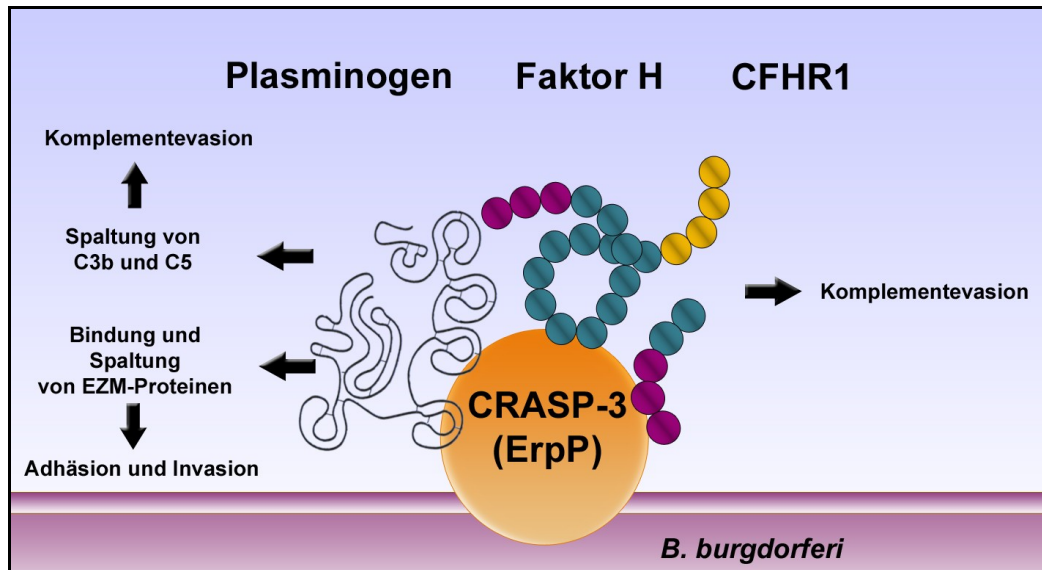


Abbildung 13: Das multifunktionale Protein BbCRASP-3 (ErpP) von *B. burgdorferi*.

Das Oberflächenprotein BbCRASP-3 bindet Plasminogen an der Oberfläche. Gebundenes Plasminogen, das zur aktiven Protease Plasmin konvertiert wurde, wird zur Komplementevasion sowie zur Adhäsion und Invasion genutzt. Die Bindung der Komplementregulatoren Faktor H und CFHR1 dienen ebenfalls zur Komplementevasion.

2. Ziel der Arbeit

Die Gram-negativen Bakterien *Haemophilus influenzae* und *Borrelia burgdorferi* verursachen invasive Erkrankungen. Bei einer Infektion des menschlichen Organismus müssen diese Mikroorganismen das Immunsystem umgehen und gleichzeitig in das Zielgewebe eindringen. Beide pathogenen Mikroorganismen entwickelten verschiedene Strategien, die parallel zur Immunevasion und Gewebsinvasion eingesetzt werden. Beide pathogene Mikroorganismen binden das menschliche Plasmaprotein Plasminogen an ihrer Oberfläche. Aufgrund der aufkommenden Antibiotikaresistenzen ist es notwendig die genauen Mechanismen der Immunevasion und Gewebsinvasion zu untersuchen und neue Angriffsziele, vor allem in der frühen Phase der Infektion zu charakterisieren.

Das Ziel dieser Arbeit ist, die Interaktion zwischen den Gram-negativen Bakterien *H. influenzae* und *B. burgdorferi* und dem menschlichen Plasmaprotein Plasminogen zu untersuchen und die Rolle von Plasminogen, dass an die Oberfläche der Mikroorganismen gebunden ist, zu charakterisieren. In dieser Arbeit sollen die Bindeproteine für Plasminogen identifiziert und die Rolle der Plasminogen-Bindung bei der Immunevasion, im speziellen bei der Komplementevasion sowie bei der Gewebsinvasion für die beiden pathogenen Mikroorganismen untersucht werden. Des Weiteren soll der Einfluss von Plasmin/ogen im Komplementsystem genauer beschrieben werden.

Die Bindung der identifizierten bakteriellen Proteine, PE von *H. influenzae* und die CRASP -3, -4 und -5 von *B. burgdorferi*, an Plasminogen soll genauer charakterisiert und die Interaktion zwischen den Proteinen bezüglich der Bindeeigenschaften und Binderegionen analysiert werden. Dazu wurde die Funktion des gebundenen Plasminogen, welches zur Serinprotease Plasmin aktiviert wurde, untersucht und die Rolle von Plasmin/ogen in der Komplementkaskade erforscht.

3. Überblick der publizierten und eingereichten Manuskripte

3.1. Manuskript 1 *Haemophilus influenzae* uses the Protein E Surface Protein to Acquire Human Plasminogen and to Evade Innate Immunity.

Diana Barthel, Birendra Singh, Kristian Riesbeck und Peter F. Zipfel

Akzeptiert in Journal of Immunology (Oktober 2011)

Das Manuskript beschreibt die Identifizierung des Plasminogen-Hauptbindepoteins von *H. influenzae*. Plasminogen bindet konzentrationsabhängig an den nichttypisierbaren *H. influenzae* Stamm NTHi 3655. Das Lysin-Analog ϵ ACA und NaCl beeinflussen die Plasminogen-Bindung, und weisen auf eine Lysinreste-vermittelte und auf Ionen basierte Bindung hin. NTHi 3655 exprimiert das Adhäsionsprotein Protein E (PE) konstitutiv an der Oberfläche und PE reflektiert als Kandidat als Plasminogen-bindendes Protein. Das rekombinante PE bindet Plasminogen konzentrationsabhängig. Diese Bindung ist abgesättigt und basiert ebenfalls auf Lysinreste und Ionenstärke. Ein PE-*knock out* Stamm (NTHi 3655 Δpe) zeigte eine um 65 % verminderte Plasminogen-Bindung, von aufgereinigten sowie aus menschlichen Serum stammenden Plasminogen, im Vergleich zum Wildtyp. Ein *E. coli*-Stamm, der PE an der Oberfläche exprimiert, zeigte zum Vergleich zu einem nicht PE-exprimierenden *E. coli*-Stamm eine 4-fach stärkere Bindung. Die Lokalisation der PE-Bindestelle für Plasminogen im N-Terminus erfolgte mit Hilfe von synthetischen PE-Peptiden. Als weiterer Ligand für PE ist Vitronektin bekannt. Beide Plasmaproteine konkurrieren nicht um die PE-Bindung und binden simultan an PE. Plasminogen, gebunden an PE wird durch den menschlichen Plasminogenaktivator uPa zur aktiven Protease konvertiert und ist funktionell aktiv. Aktiviertes Plasminogen, gebunden an NTHi 3655 bzw. PE, spaltet das EZM Protein Fibrinogen und das Komplementprotein C3b und wird damit zur Gewebsinvasion und Immunevasion von *H. influenzae* genutzt.

Beiträge der Autoren

Diana Barthel hat das Manuskript zusammen mit Peter F. Zipfel geschrieben und hat folgende Experimente geplant, durchgeführt und interpretiert: Bindestudien von

Plasminogen an NTHi 3655 und an rekombinantem PE (ELISA, FACS, „*direct-binding-Assay*“ und Absorptionsassay), Kompetitionsanalyse, Lokalisation der PE-Binderegion, Aktivierung von Plasminogen, Fibrinogen- und C3b-Spaltung.

Birendra Singh klonierte, exprimierte und reinigte das rekombinante PE-Protein auf und war an der Planung der synthetischen PE-Peptide beteiligt.

Kristian Riesbeck plante das Manuskript und war am Korrekturlesen und der Diskussion beteiligt.

Peter F. Zipfel plante die Arbeit und war am Schreiben des Manuskriptes beteiligt.

Unterschrift Prof. Peter F. Zipfel

3.2. Manuskript 3: *Borrelia burgdorferi* Infection-Associated Surface Proteins ErpP, ErpA, and ErpC Bind Human Plasminogen.

Catherine A. Brissette, Katrin Haupt, **Diana Barthel**, Anne E. Cooley, Amy Bowman, Christine Skerka, Reinhard Wallich, Peter F. Zipfel, Peter Kraiczky and Brian Stevenson

Infection and Immunity (2009), 77(1):300-306

Das Manuskript beschreibt die Bindung des menschlichen Plasmaproteins Plasminogen an die Proteine ErpP (BbCRASP-3), ErpA (BbCRASP-4) und ErpC (BbCRASP-5) von *B. burgdorferi*. Die bakteriellen Proteine ErpP, ErpA und ErpC gehören zu der Erp-Familie und sind Membran-gebundene Proteine mit einer Größe von ca. 19-21 kDa und einer Homologie von >98 %. Plasminogen bindet an drei von fünf getesteten Proteinen der Erp-Familie und diese Bindung ist konzentrationsabhängig. Die Bindung von Plasminogen an ErpP, ErpA und ErpC beruht auf der Interaktion von Lysinreste der Erp-Proteine und der Lysinbindestellen von Plasminogen. NaCl und Heparin zeigten keinen bzw. einen sehr geringen Effekt auf die Plasminogen-Bindung an die Erp-Proteine, so dass die Bindung nicht auf Ionische Kräfte basiert. Für die Erp-Proteine ist bekannt, dass sie den Komplementregulator Faktor H binden. Die Plasmaproteine Plasminogen und Faktor H zeigen keine Kompetition in ihrer Bindung an die Erp-Proteine und binden somit simultan. Plasminogen, gebunden an ErpP, ErpA und ErpC wird durch den menschlichen Aktivator uPa zur aktiven Serinprotease Plasmin konvertiert und setzt das chromogene Substrat S-2251 spezifisch um.

Beiträge der Autoren

Catherine A. Brissette hat das Manuskript zusammen mit Peter F Zipfel und Brian Stevenson geschrieben und folgende Experimente geplant, durchgeführt und interpretiert: Bindungsstudie (ELISA) und Alignment der Erp-Proteine.

Katrin Haupt war an der Planung und Ausführung des Kompetitionsassay beteiligt.

Diana Barthel war an der Planung und Ausführung des Plasminogen-Aktivierungs-Assays beteiligt.

Anne E. Cooley und Amy Bowman waren an der Planung und bei der Durchführung der Bindungsstudien mit ϵ ACA, NaCl und Heparin beteiligt.

Reinhard Wallich, Peter Kraizcy, Christine Skerka und Peter F. Zipfel planten das Manuskript und waren am Korrekturlesen und der Diskussion beteiligt.

Brian Stevenson war an der Planung der Arbeit und am Schreiben des Manuskriptes beteiligt.

Unterschrift Prof. Peter F. Zipfel

3.3. Manuskript 3: Plasminogen is a Potent Complement Inhibitor.

Diana Barthel, Susann Schindler und Peter F. Zipfel

Eingereicht

Dieses Manuskript charakterisiert die Rolle des menschlichen Plasmaproteins Plasminogen als Komplementregulator. Plasminogen interagiert mit den Komplementproteinen C3 und C5 konzentrationsabhängig. Plasminogen bindet die C3-Aktivierungsfragmente C3b, C3c und C3d, jedoch nicht das Anaphylatoxin C3a. Die Plasminogen-Bindung an C3, sowie an C3b und C3d basiert auf Lysinreste und Ionenstärke. Plasminogen kompetitiert mit dem Komplementregulator Faktor H um die Bindung an C3b. Die Plasminogen-C5 Interaktion basiert ebenfalls auf Lysinreste und auf Ionenstärke. Plasminogen verstärkt aufgrund einer verstärkten Spaltung von C3b durch Faktor I die Kofaktoraktivität von Faktor H. Des Weiteren spaltet Plasmin, welches durch uPa aktiviert wurde, in Flüssigphase sowie gebunden an einer Oberfläche die Komplementproteine C3b und C5. Diese Spaltung wird durch die Plasmininhibitoren α_2 -Antiplasmin und Aprotinin inhibiert und ist somit spezifisch für Plasmin. Plasmin spaltet C3b in einem differenzierten Spaltungsmuster wie Faktor I. Im Hämolyse-Assay und in einem komplementspezifischen ELISA besitzt Plasmin eine inhibitorische Aktivität bei der Komplementaktivierung über den alternativen und klassischen Weg und ist konzentrationsabhängig. Bei physiologischen Plasmin(ogen)-Konzentrationen liegt eine Inhibierung des alternativen Weges von 60 % vor und des klassischen Weges von 80 %. Eine verminderte Generierung von C3a ist in einem für den alternativen Weg-spezifischen Assay gezeigt und der Einfluss von Plasmin bestätigt.

Beiträge der Autoren

Diana Barthel hat das Manuskript zusammen mit Peter F. Zipfel geschrieben und folgende Experimente geplant, durchgeführt und interpretiert: Bindungsstudien (ELISA und Liganden-Blot), Kompetitionsanalyse, Kofaktorassay, Spaltungs-Assay, Hämolyseassay, Zymosan-Assay.

Susann Schindler war mit an der Planung und Ausführung des Spaltungs-Assays mit C3b beteiligt.

Peter F. Zipfel war an der Planung der Arbeit und am Schreiben des Manuskriptes beteiligt.

Unterschrift Prof. Peter F. Zipfel

4. Manuskripte

4.1. Manuskript 1: *Haemophilus influenzae* uses the Protein E Surface Protein to Acquire Human Plasminogen and to Evade Innate Immunity.

The Journal of Immunology

Haemophilus influenzae Uses the Protein E Surface Protein to Acquire Human Plasminogen and to Evade Innate Immunity

Diana Barthel,* Birendra Singh,[†] Kristian Riesbeck,[‡] and Peter F. Zipfel*[‡]

Pathogenic microbes acquire the human plasma protein plasminogen to their surface. In this article, we characterize binding of this important coagulation regulator to the respiratory pathogen nontypeable *Haemophilus influenzae* and identify the *Haemophilus* protein E (PE) surface protein as a new plasminogen-binding protein. Plasminogen binds dose dependently to intact bacteria and to purified PE. The plasminogen-PE interaction is mediated by lysine residues and is also affected by ionic strength. The *H. influenzae* PE knockout strain (nontypeable *H. influenzae* 3655Δpe) bound plasminogen with ~65% lower intensity as compared with the wild-type, PE-expressing strain. In addition, PE expressed ectopically on the surface of *Escherichia coli* also bound plasminogen. Plasminogen, either attached to intact *H. influenzae* or bound to PE, was accessible for urokinase plasminogen activator. The converted active plasmin cleaved the synthetic substrate S-2251, and the natural substrates fibrinogen and C3b. Using synthetic peptides that cover the complete sequence of the PE protein, the major plasminogen-binding region was localized to a linear 28-aa-long N-terminal peptide, which represents aa 41–68. PE binds plasminogen and also vitronectin, and the two human plasma proteins compete for PE binding. Thus, PE is a major plasminogen-binding protein of the Gram-negative bacterium *H. influenzae*, and when converted to plasmin, PE-bound plasminogen aids in immune evasion and contributes to bacterial virulence. *The Journal of Immunology*, 2012, 188: 000–000.

Plasminogen is a 92-kDa, single-chain, human plasma glycoprotein that circulates as an inactive proenzyme. This coagulation regulator is composed of an N-terminal pre-activation peptide, five consecutive disulfide-bonded kringle domains (K1–K5), followed by a serine protease domain (1–3). Plasminogen, which has a plasma concentration of ~200 µg/ml, is synthesized and secreted by liver cells and is also present in extracellular body fluids (4). Proteolytic processing of plasminogen by human urokinase-type (uPA), by tissue-type plasminogen activators, and also by the bacterial streptokinase and staphylokinase generates the active protease plasmin (5–7). Plasmin as a key enzyme in fibrinolysis and homeostasis degrades components of the extracellular matrix (ECM) and the basement membrane, including fibrinogen, fibrin, and laminin (8). In addition, plasmin activates matrix metalloproteases and elastase, which regulate wound healing, tissue remodeling, tumor metastasis, and angiogenesis (9, 10).

Haemophilus influenzae is a Gram-negative pathogen that frequently colonizes the human respiratory tract. These opportunistic bacteria are divided into encapsulated and unencapsulated strains; the latter are also termed nontypeable *H. influenzae* (NTHi) (11–13). Encapsulated *Haemophilus* strains are subdivided into serotypes a–f, with *H. influenzae* strain b being the most virulent (14).

H. influenzae strain b strains often cause bacteremia, pneumonia, and acute bacterial meningitis, and occasionally osteomyelitis, epiglottitis, and joint infections (11, 15, 16). Strain NTHi 3655 is often associated with local upper and lower respiratory tract infections, including acute otitis media, sinusitis, and chronic obstructive pulmonary disease (11, 17, 18). *H. influenzae* is after *S. pneumoniae* the second most common cause of chronic obstructive pulmonary disease (19).

Protein E (PE) of *H. influenzae* is a 16-kDa outer membrane lipoprotein with adhesive properties (20). PE mediates adhesion to and activates human epithelial cells. The *pe* gene is constitutively expressed in NTHi and is highly conserved among clinical NTHi isolates (21). PE uses the central 24-aa-long core domain (i.e., aa 84–108) to contact human epithelial cells and to induce proinflammatory responses. PE also binds human vitronectin, an ECM component, adhesion protein and terminal complement regulator (22).

Infections are generally associated with local inflammation and epithelial cell damage that results in the exposure of the underlying ECM (23–25). Bacterial pathogens acquire plasminogen when in contact with human plasma or body fluids. Surface-bound plasminogen enhances interaction with host ECM components, and mediates adhesion and colonization (7, 8). Plasminogen attached to most microbial surfaces is accessible for human and also for bacterial activators that form the active serine protease plasmin. *H. influenzae*, similar to other pathogenic bacteria, including hemolytic group A, C, and G streptococci and pneumococci, use plasminogen to adhere and attach to the ECM (26, 27). Currently, aspartase is the only identified plasminogen-binding protein of *H. influenzae* (28, 29). However, most pathogenic microbes including *Borrelia burgdorferi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, and the yeast *Candida albicans* express several plasminogen-binding proteins (7, 30–39).

Given the central role of human plasminogen for bacterial immune evasion and ECM interaction, we wanted to define the role of plasminogen for immune escape of *H. influenzae*. First, we characterized plasminogen binding of NTHi and identified PE as

*Department of Infection Biology, Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology, 07745 Jena, Germany; [†]Medical Microbiology, Department of Laboratory Medicine, Skåne University Hospital Malmö, Lund University, Malmö, Sweden; and [‡]Friedrich Schiller University, 07743 Jena, Germany

Received for publication June 30, 2011. Accepted for publication October 19, 2011. This work was supported by the German Academic Exchange Service (Deutscher Akademischer Austausch Dienst).

Address correspondence and reprint requests to Prof. Peter F. Zipfel, Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology, Hans-Knöll-Institute, Beutenbergstrasse 11a, 07745 Jena, Germany. E-mail address: peter.zipfel@hki-jena.de

Abbreviations used in this article: eACA, ϵ -amino caproic acid; BHI, brain heart infusion; ECM, extracellular matrix; NHS, normal human serum; NTHi, nontypeable *Haemophilus influenzae*; PBS-T, PBS + 0.05% Tween 20; PE, protein E.

Copyright © 2011 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/11/\$16.00

www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1101927

a novel and major plasminogen-binding protein. Plasminogen bound to intact bacteria or to recombinant PE was accessible for uPA. UPa-activated plasmin cleaved the synthetic chromogenic substrate S-2251 and the natural substrates fibrinogen and also C3b. A linear stretch of 28 N-terminal aa was identified as the major linear plasminogen binding region. Thus, the Gram-negative, nontypeable bacterium *H. influenzae* uses the PE surface protein to acquire human plasminogen and uses surface-bound plasmin for complement evasion, innate immune escape, and ECM degradation.

Materials and Methods

Bacterial strains, reagents, and cell culture

NTHi strain 3655 and the isogenic PE knockout strain (NTHi 3655 Δ pe) were grown in brain heart infusion (BHI) liquid broth, supplemented with NAD and hemin (each 10 μ g/ml). In addition, bacteria were plated on chocolate agar plates and incubated in a humid atmosphere at 37°C and 5% CO₂. The NTHi 3655 Δ pe mutant was grown in the presence of 20 μ g/ml kanamycin (20). *Escherichia coli* BL21 (DE3) were grown in Luria-Bertani liquid broth, and PE transformants were cultivated with 50 μ g/ml ampicillin (20).

Proteins and Abs

Human plasminogen, uPA (Haemochrom Diagnostica), and vitronectin (CompTech) were used for binding studies, and complement protein C3b (CompTech) and fibrinogen (Calbiochem) were used for functional assays. Human proteins were identified with goat antiserum specific for plasminogen (Acris Abs), vitronectin (CompTech), or C3b (CompTech), or rabbit antiserum specific for fibrinogen (Calbiochem). Corresponding secondary antisera (rabbit antiserum specific for goat or goat antiserum specific for rabbit) were purchased from Dako and the lysine analog ϵ -amino caproic acid (ϵ ACA) from Sigma.

For expression of recombinant PE²²⁻¹⁶⁰, *E. coli* were transfected with the corresponding vector and protein expression was induced with IPTG for 3.5 h. Bacteria were lysed, and after centrifugation, the pellet was resuspended in cold PBS supplemented with lysozyme (0.1 mg/ml), sonicated, and then centrifuged again. Soluble recombinant PE was purified under native conditions by nickel chromatography (Novagen) (20).

[¹²⁵I] labeling and protein binding to bacteria ("direct binding assay")

Plasminogen was labeled with [¹²⁵I] by the Chloramide-T method (20). For labeling, 0.05 M [¹²⁵I] (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, U.K.) was used per mole of protein. The labeled proteins were separated from free [¹²⁵I] using PD10 columns (GE Healthcare Biosciences, Uppsala, Sweden).

Wild-type NTHi 3655 and the knockout strain were grown in BHI media until OD₆₀₀ = 1.0; then bacteria were washed in PBS supplemented with 2.5% BSA. After counting, bacteria (10⁸ cells/ml) were seeded in 96-well microtiter plates. [¹²⁵I]plasminogen was added at the indicated concentrations, and the mixture was incubated for 30 min at 37°C. Thereafter, bacteria were pelleted at 4200 \times g for 10 min and washed twice in PBS + 2.5% BSA to remove unbound plasminogen. Cells were harvested in a 96-well plate harvester (Tomtec, Hamden, CT), and the radioactivity was counted using a liquid scintillation counter (Trilux, Microbeta 1450; Perkin Elmer). All assays were performed in triplicate, and each assay was repeated at least three times.

Flow cytometry

Plasminogen binding to bacteria was analyzed by flow cytometry. Wild-type NTHi 3566 bacteria were grown in BHI, washed with PBS supplemented with BSA (PBS-1% BSA), and incubated with plasminogen, used at concentrations from 0.75 to 3.0 μ g. After two washing steps, goat antiserum specific for human plasminogen was added and bound to the coated bacteria for a further 30 min at room temperature. After washing, Alexa 647-conjugated goat antiserum was added. Following two additional washing steps, bacteria were analyzed by flow cytometry (Accuri, St. Ives, Cambs, U.K.). All incubation steps were performed in a volume of 100 μ l PBS-1% BSA, and the same buffer was used for all washing steps.

Protein-binding assays

Purified PE or seven synthetic peptides (each at 0.5 μ g in 50 μ l PBS) that represent the entire PE sequence and have an overlap of 4 amino acids were immobilized onto a 96-well microtiter plate (Nunc) overnight at 4°C (20, 22). After washing three times with PBS-T (PBS + 0.05% Tween 20), Blocking Buffer 1 (AppliChem) was added and the mixture was incubated for 2 h at 37°C. Then plasminogen (0.5 μ g in 50 μ l PBS) was added either alone or together with the lysine analog ϵ ACA or NaCl. After incubation for 1.5 h at room temperature, unbound protein was removed by washing (three times with PBS-T), and bound plasminogen was identified after incubation with appropriate antiserum (goat plasminogen antiserum, 1:1000). After washing with PBS-T, HRP-conjugated goat antiserum (1:2000 dilution in PBS-T) was added and the mixture was incubated for 1 h at room temperature. After three additional washing steps and addition of tetramethylbenzidine, the reaction was stopped by addition of 2 M H₂SO₄, and the absorption was determined at 450 nm using a microtiter plate reader. All further binding assays were performed at physiological NaCl levels of 150 mM.

The effect of vitronectin on plasminogen binding to immobilized PE was analyzed by ELISA. Plasminogen (used at 1 μ g/well) and vitronectin were combined at different molar ratios and then bound to immobilized PE (0.5 μ g/well). Similarly, plasminogen, used at different molar levels, was combined with a constant amount of vitronectin (1 μ g/well) and added to immobilized PE. In addition, normal human serum (NHS; 20%, diluted in DPBS) was used for PE binding under physiological conditions. After incubation and extensive washing, each bound human serum protein was detected with specific antiserum.

Plasminogen binding and protein absorption assay

Wild-type NTHi 3655, the knockout strain NTHi 3655 Δ pe, wild-type *E. coli*, or *E. coli* expressing PE was incubated in buffer supplemented with plasminogen (20 μ g/ml) or 10% heat-inactivated NHS for 1.5 h at 37°C. After extensive washing, bacteria were treated with elution buffer (60 mM Tris, 2% SDS, 25% glycerol) for 20 min at 37°C. The supernatant was collected, separated by SDS-PAGE, and transferred to a membrane by semidry blotting. Plasminogen was identified with a goat antiserum (antiplasminogen 1:2000 in PBS-T) together with an appropriate HRP-goat antiserum (1:2000 in PBS-T).

Plasminogen activation and plasmin activity

The proteolytic activity of activated plasmin was determined as described previously (37). In brief, purified PE (0.25–2.0 μ g dissolved in 50 μ l carbonate-bicarbonate buffer) was immobilized onto a microtiter plate. After blocking with PBS supplemented with 2% BSA, plasminogen (0.6 μ g/well) was added. After incubation at 1.5 h at room temperature, unbound plasminogen was removed by washing with PBS-T. Then uPA (4 ng/well) together with the chromogenic substrate S-2251 (D-valyl-leucyl-lysine-p-nitroanilide dihydrochloride, 100 μ g/well; Sigma Aldrich) dissolved in reaction buffer (64 mM Tris, 350 mM NaCl, 0.01% Triton X; pH 7.5) were added. The plate was incubated at 37°C for 24 h, and cleavage of the chromogenic substrate was followed over a period of 24 h by measuring the absorbance at 405 nm.

Similarly, the activity of plasmin attached to the bacterial surface was analyzed. To this end, plasminogen (2 μ g) was bound to intact bacteria (1 \times 10⁸ cells) and the effect of the lysine analog ϵ ACA (5 mM) on binding and activation was analyzed for 1.5 h at 37°C. After washing with PBS, uPA (1 μ g) and the chromogenic substrate S-2251 dissolved in reaction buffer was added and substrate cleavage was recorded.

Fibrinogen and C3b degradation

Degradation of the natural substrate fibrinogen or C3b by PE-bound and activated plasminogen was assayed. Plasminogen (5 μ g/well) was bound to immobilized PE (5 μ g/well) and after blocking, fibrinogen (0.5 μ g, plasminogen depleted; Calbiochem) or C3b (0.5 μ g) together with plasminogen activator uPA (4 ng/well) were added. The mixture was incubated at room temperature. At the indicated time points, aliquots were removed and the reaction was stopped by adding reducing buffer. Then the samples were heated for 5 min at 95°C, separated by SDS-PAGE, and transferred to a membrane (40). The degradation products were monitored by Western blotting using rabbit fibrinogen or goat C3 antiserum and the corresponding secondary HRP-conjugated antiserum.

Statistics

Results were assessed by Student *t* test for paired data. A *p* value ≤ 0.05 was considered to be statistically significant (**p* ≤ 0.05 , ***p* ≤ 0.01 , ****p* ≤ 0.001).

Results

Plasminogen binds to intact H. influenzae

Binding of plasminogen to intact *H. influenzae* strain NTHi 3655 was assayed. Bacteria were incubated with [125 I]plasminogen, and after extensive washing, bound plasminogen was determined by counting the radioactivity. Plasminogen bound to intact NTHi 3655 and binding were dose dependent (Fig. 1A). Plasminogen binding was also observed using flow cytometry (Fig. 1B).

To analyze whether lysine residues are relevant for plasminogen binding to intact bacteria, we assayed the effect of ϵ ACA. This lysine analog inhibited plasminogen binding to NTHi 3655, and again the effect was dose dependent. ϵ ACA, at a concentration of 1 mM, inhibited plasminogen binding by 75% (Fig. 1C). In addition, the effect of ionic strength was assayed. NaCl inhibited plasminogen binding. At the physiological level (i.e., 150 mM), NaCl decreased plasminogen binding by 25%, and at a concentration of 1 M, NaCl inhibited the interaction by almost 60% (Fig. 1D). Thus, plasminogen binding to NTHi 3655 bacteria depends on lysine residues and is affected by ionic strength.

Plasminogen also bound to bacteria, which were collected at different growth stages, and binding was of similar intensity. Thus, plasminogen binding to *H. influenzae* is independent of the growth

phase, and the bacterial plasminogen-binding protein(s) seems to be expressed constitutively (data not shown).

PE is a plasminogen-binding protein of NTHi

Because NTHi 3655 isolates express PE on their surface (21), this bacterial surface and adhesion protein was considered as a candidate ligand for plasminogen. Therefore, binding of plasminogen to recombinant PE was assayed. Plasminogen bound to immobilized, full-length, recombinant PE^{22–160} and binding were dose dependent. Plasminogen binding was saturated at a concentration of 50 μ g/ml, which is ~ 4 -fold lower than the serum level (Fig. 2A).

Plasminogen binding to *Haemophilus* bacteria is mediated by lysine residues and is ionic strength dependent. We therefore asked whether the plasminogen–PE interaction is similarly affected by these agents. First, the effect of ϵ ACA was tested. This lysine analog inhibited plasminogen binding to immobilized PE and at 1 mM ϵ ACA inhibited binding by 60% (Fig. 2B). Similarly, NaCl affected the interaction. At the physiological level of 150 mM, NaCl reduced plasminogen binding to PE by 25%, and at 1.0 M, by 75% (Fig. 2C). Thus, plasminogen binds to PE of *H. influenzae*; binding is mediated by lysine residues and is of ionic nature.

Plasminogen binds to a H. influenzae PE knockout strain with lower intensity and binds to ectopically expressed PE

To further prove that PE of NTHi 3655 is a plasminogen-binding protein, we studied plasminogen binding to a PE knockout strain (NTHi 3655 Δ pe) (22). [125 I]plasminogen bound to NTHi 3655 Δ pe with low intensity. When compared with the wild-type, PE-expressing strain, binding was reduced by 65% (Fig. 3A). To provide further proof that PE binds plasminogen, we assayed binding to PE expressed on the surface of *E. coli* (20). [125 I]plasminogen binding to ectopically expressed PE was 4-fold higher as compared with non-PE-expressing bacteria (Fig. 3B).

To further characterize the relevance of PE for plasminogen attachment, we assayed binding of both purified and serum-derived plasminogen to knockout, to wild-type NTHi 3655, and similarly to PE-expressing and nonexpressing *E. coli*. Bacteria were incubated either in purified plasminogen or in human serum. After extensive washing, bound proteins were eluted, separated by SDS-PAGE, transferred to a membrane, and plasminogen was detected by Western blotting. Purified, as well as serum-derived, plasminogen

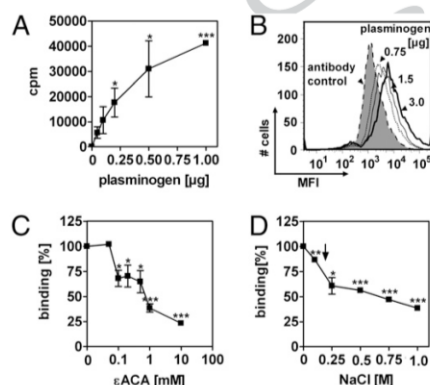


FIGURE 1. Plasminogen binds to *H. influenzae*. *A*, Plasminogen binding to NTHi 3655 was assayed using a “direct binding assay.” [125 I]plasminogen used at increasing concentrations (0.05–1.0 μ g) was bound to intact bacteria. After extensive washing, the amount of bound plasminogen was determined by counting the radioactivity. *B*, Plasminogen binding to intact bacteria was also analyzed by flow cytometry. Again, plasminogen used at concentrations ranging from 0.75 to 3.0 μ g was bound to wild-type NTHi 3655. After extensive washing, a goat plasminogen antiserum and an Alexa 647-conjugated goat antiserum were added, and surface-bound plasminogen was assayed. *C*, The inhibitory effect of the lysine analog ϵ ACA for binding of [125 I]plasminogen to NTHi 3655 was evaluated. Bound plasminogen was determined by counting the radioactivity. The signal obtained in the absence of ϵ ACA was set at 100%. *D*, The effect of NaCl on [125 I]plasminogen binding to NTHi 3655 was evaluated. Plasminogen binding was determined by counting the radioactivity, and the amount of plasminogen bound in the absence of NaCl was set at 100%. At the physiological level, plasminogen binding was reduced by 25% (shown by \downarrow). Mean values of three independent experiments are shown; errors bars indicate SD. For flow cytometry, the result of a typical experiment out of three is shown. **p* ≤ 0.05 , ***p* ≤ 0.01 , ****p* ≤ 0.001 .

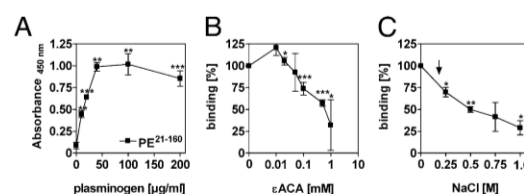


FIGURE 2. PE is a plasminogen-binding protein of NTHi. *A*, Plasminogen binding to recombinant PE was assayed by ELISA. Plasminogen, used at increasing concentrations (10–200 μ g/ml), was bound to immobilized PE (0.5 μ g/well), and after extensive washing, bound plasminogen was detected with goat plasminogen and HRP-goat antiserum by measuring the absorbance at 450 nm. *B*, Plasminogen was bound to PE and the effect of ϵ ACA was assayed. Bound plasminogen was detected with goat plasminogen antiserum and HRP-goat antiserum. Plasminogen binding to PE in the absence of ϵ ACA was set at 100%. *C*, The effect of NaCl on plasminogen binding to PE was assayed. Again, binding of plasminogen to PE in the absence of NaCl was set at 100%. At the physiological level (0.15 M, shown by \downarrow), NaCl reduced plasminogen binding by 25%. The mean values of three experiments and SD are shown. **p* ≤ 0.05 , ***p* ≤ 0.01 , ****p* ≤ 0.001 .

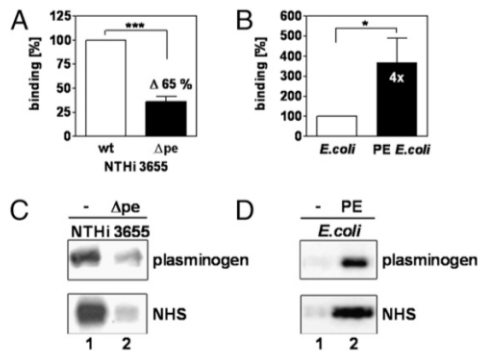


FIGURE 3. Binding of plasminogen to the *H. influenzae* PE knockout strain and to ectopically expressed PE. A, Plasminogen binding to the PE knockout strain (NTHi 3655 Δ pe) was assayed in a “direct binding assay.” [125 I]plasminogen was bound to NTHi 3655 Δ pe or to wild-type NTHi 3655. After extensive washing, bound plasminogen was quantitated by counting the radioactivity. Binding of [125 I]plasminogen to the wild-type strain was set at 100%. Plasminogen binding to the PE knockout strain was reduced by 65%. B, Plasminogen bound to PE ectopically expressed by *E. coli*. Plasminogen bound to PE-expressing *E. coli* with about four times higher intensity. The mean values of three experiments and SDs are shown for A and B. C, Binding of purified and serum-derived plasminogen to the wild-type strain (lane 1) and to the PE knockout strain (lane 2) was assayed using an “absorption assay.” After extensive washing, bound proteins were eluted, separated by SDS-PAGE, transferred to a membrane, and plasminogen was identified by Western blotting using goat plasminogen antiserum and HRP-goat antiserum. D, Binding of purified and serum-derived plasminogen was assayed to wild-type *E. coli* (lane 1) and to PE-expressing *E. coli* (lane 2). Results in C and D show a representative result of three independent experiments. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.001$.

bound to wild-type NTHi 3655 (Fig. 3C, lane 1) and to PE-expressing *E. coli* (Fig. 3D, lane 2). Both purified and serum-derived plasminogen bound with much lower intensity to the PE knockout strain (Fig. 3C, lane 2) or to the non-PE-expressing *E. coli* (Fig. 3D, lane 1). The lower binding to the PE knockout strain and also the strong binding to *E. coli* that ectopically express PE show that PE is one major plasminogen-binding protein of *H. influenzae*. The reduced but existing binding to the PE knockout strain is in agreement with the existence of at least one additional plasminogen protein of *H. influenzae*, that is, aspartase (29).

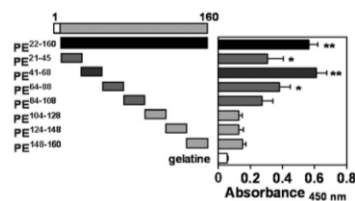


FIGURE 4. Localization of the plasminogen-binding region in PE. Plasminogen binding was analyzed to full-length PE and to linear synthetic peptides that have a length of 17–25 aa and an overlap of 4 residues, and that span the entire PE sequence. After extensive washing, bound plasminogen was detected with a goat plasminogen antiserum together with HRP-goat antiserum, and the absorbance at 450 nm was determined. Gelatin was used as control. Results represent mean values of three independent experiments, and error bars show SD. The significance values were calculated using PE¹⁴⁰⁻¹⁶⁰ as a reference for a nonbinding protein. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

Localization of the plasminogen binding region in PE

To localize the plasminogen binding region in the PE protein, we synthesized short linear peptides, with a length of 17–25 aa and an overlap of 4 residues. These synthetic peptides, which span the entire PE protein, were immobilized onto a microtiter plate and plasminogen binding was assayed. Plasminogen bound to full-length PE bound with highest intensity to PE⁴¹⁻⁶⁸ and did also bind to peptides PE²¹⁻⁴⁵, PE⁶⁴⁻⁸⁸, and PE⁸⁴⁻¹⁰⁸. Plasminogen did not bind to peptides PE¹⁰⁴⁻¹²⁸, PE¹²⁴⁻¹⁴⁸, and PE¹⁴⁸⁻¹⁶⁰ (Fig. 4). Thus, the 28 N-terminal residues (i.e., aa 41–68) represent the major linear plasminogen binding region of PE.

Plasminogen and vitronectin compete for PE binding

PE binds plasminogen and also vitronectin. The major plasminogen binding region was localized to the N terminus of PE, and similarly the major vitronectin binding region of PE was localized within the N terminus, to a linear stretch of 24 residues that represent 84–108 aa (20).

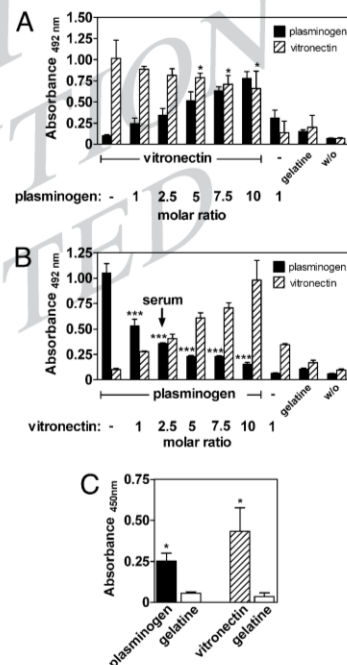


FIGURE 5. Binding of plasminogen and vitronectin to PE. A, Plasminogen and vitronectin compete for PE binding. Vitronectin was combined with different amounts of plasminogen, the mixture was bound to immobilized PE, and after washing, both bound vitronectin and plasminogen were detected with specific antisera (i.e., goat plasminogen or goat vitronectin). Binding to a gelatin-coated surface in the absence of PE was used as negative control. B, Binding was also analyzed in a reverse setting. Plasminogen together with increasing amounts of vitronectin were bound to immobilized PE, and binding of both proteins was assayed. Again, binding to a gelatin-coated surface in the absence of a specific ligand was used to determine background binding. Both plasminogen and vitronectin, when used at the physiological ratio of 1:2.5 bound to PE (A, B, third column pair; ↓). C, Binding of both plasminogen and vitronectin derived from NHS to immobilized PE was assayed. NHS was added to immobilized PE, and after washing, bound proteins were detected by specific antisera (i.e., goat plasminogen or goat vitronectin). The mean value of four independent experiments and the SD are indicated. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

Because the N terminus of PE includes the major binding regions for these two human plasma proteins, we next asked whether plasminogen or vitronectin bind simultaneously to the bacterial PE protein and whether the two human proteins compete for PE binding. Both plasminogen and vitronectin bound to immobilized PE. However, plasminogen used at increasing levels affected binding of vitronectin to PE. At a 10-M excess, plasminogen bound to PE and vitronectin binding was reduced by ~20% (Fig. 5A, column pair 6). Thus, PE has still free binding sites for the competing protein plasminogen. A similar result was observed when a reverse setting was used (Fig. 5B). Again, both human plasma proteins bound to immobilized PE. In this setup, increasing levels of vitronectin inhibited plasminogen binding to PE in a stronger extent. Thus, the binding of PE to vitronectin is benefited compared with plasminogen.

When the two human proteins were applied at the molar ratio that corresponds to their plasma levels (i.e., 1:2.5), both plasminogen and vitronectin bound to PE (Fig. 5B). In addition, binding of both human plasma proteins to immobilized PE was confirmed when NHS was used as a protein source (Fig. 5C). Thus, at the physiological level, PE binding sites are accessible for both plasminogen and vitronectin; however, the two human plasma proteins also compete for binding.

Plasminogen bound to PE or to intact bacteria is converted to functionally active plasmin

The protease plasmin cleaves fibrin clots, ECM components, and the complement protein C3b (8). We therefore asked whether plasminogen bound to PE is accessible for the activator uPa and

can be converted to the active protease plasmin. To this end, plasminogen was bound to immobilized PE; after extensive washing, the activator uPa was added and the activity of newly generated plasmin was assayed. Plasminogen bound to PE activated by uPa and cleaved the chromogenic substrate S-2251 in a dose-dependent manner (Fig. 6A).

In addition, we assayed whether plasminogen bound to the bacterial surface is also activated by uPa. To this end, plasminogen was bound to wild-type NTHi 3655 or to the PE knockout strain, and after activation by uPa, cleavage of the synthetic chromogenic substrate S-2251 was assayed. In this case, newly generated plasmin cleaved the chromogenic substrate S-2251. This effect was dose dependent (Fig. 6B, squares). Plasminogen binds with lower intensity to the PE knockout strain and in this setup, when treated with uPa proteolytic activity was reduced by ~50% (Fig. 6B, diamonds). Similarly, in the presence of ϵ ACA, which blocks plasminogen binding to PE, proteolytic activity was reduced by ~60% (Fig. 6B, triangles). Thus, plasminogen bound to the surface of intact *H. influenzae* is activated to the active protease plasmin.

In addition, the activity of plasminogen bound to PE was assayed. Plasminogen was bound to immobilized PE and after washing, uPa and the substrate fibrinogen were added. After incubation, the reaction mixture was separated by SDS-PAGE, transferred to a membrane, and fibrinogen was detected by Western blotting. Bound plasminogen when activated to plasmin cleaved the natural substrate fibrinogen and cleavage was time dependent. Cleavage of fibrinogen started after 15 min, and the substrate fibrinogen was totally cleaved after 2 h (Fig. 6C).

To prove the biological relevance of plasmin(ogen) at the bacterial surface, we assayed cleavage of the natural substrate fibrinogen. Again, plasminogen was bound to intact bacteria. After washing, the coated bacteria were transferred to a microtiter plate, and uPa and fibrinogen were added. After incubation, the reaction

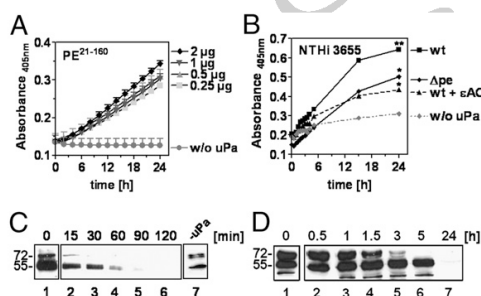


FIGURE 6. Plasminogen bound to PE and to intact bacteria is functionally active. **A**, Plasminogen was attached to PE that was immobilized at different concentrations. After extensive washing, the activator uPa (4 ng/well) together with the chromogenic substrate S-2251 were added, and conversion of the chromogenic substrate was assayed by measuring the absorbance at 405 nm. Assays performed in the absence of uPa were used as negative control. The mean values of three independent experiments and the SDs are indicated. **B**, Similarly, plasminogen was bound to intact bacteria, that is, wild-type NTHi 3655 (■) or to the PE knockout strain (◆). After washing, the activator uPa and the chromogenic substrate S-2251 were added together with the inhibitor ϵ ACA (▲). Plasminogen bound to bacteria where no uPa was added was used as control. A representative experiment out of three independent assays is shown. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$. **C**, Degradation of the natural substrate fibrinogen by plasmin(ogen) bound to immobilized PE. Plasminogen was bound to immobilized PE and after washing, uPa together with fibrinogen were added. At the indicated time points, samples were removed, separated by SDS-PAGE, transferred to a membrane, and degradation of fibrinogen was assayed by Western blotting using a rabbit fibrinogen antiserum and a HRP-rabbit antiserum (lanes 1–7). **D**, Plasminogen was bound to intact bacteria (i.e., NTHi 3655), and after extensive washing, uPa and fibrinogen were added. At the indicated time points, samples were removed, separated by SDS-PAGE, and fibrinogen degradation was followed by Western blotting (lanes 1–7). A representative experiment out of three independent assays is shown.

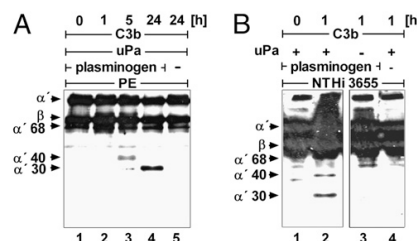


FIGURE 7. Plasminogen bound to PE cleaves the complement protein C3b. **A**, Plasminogen was bound to immobilized PE; then the activator uPa (4 ng/well) and the substrate C3b (5 µg/ml) were added. At the indicated time, the reaction mixture was removed, separated by SDS-PAGE, and after transfer to a membrane, cleavage of C3b was assayed by Western blotting using goat C3 and HRP-goat antisera. C3b is identified by the α' -chain and the β -chain (lane 1). C3b degradation is visualized by the appearance of the cleavage products as α' 68 and α' 40 bands after 5 h (lane 3) and the α' 30 fragment after 24 h (lane 4). In the absence of plasminogen, C3b remained intact and not cleaved (lane 5). **B**, Plasminogen bound to intact NTHi 3655 cleaved C3b. Plasminogen was bound to bacteria, and after washing, the activator uPa and the substrate C3b were added. After incubation, the reaction mixtures were separated by SDS-PAGE and cleavage of C3b was assayed by Western blotting. Plasminogen when activated to plasmin-cleaved C3b was visualized by appearance of the cleavage products of α' 68, α' 40, and α' 30 after 1 h (lanes 1, 2). C3b remained intact and was not cleaved when bacteria were incubated with plasminogen in the absence of the activator uPa (lane 3) or when the activator uPa was absent (lane 4). A representative experiment out of four is shown.

mixtures were separated by SDS-PAGE, transferred to a membrane, and fibrinogen, as well as fibrinogen cleavage fragments, were identified by Western blotting. Fibrinogen cleavage started after 1 h, and after 24 h, the fibrinogen bands were absent (Fig. 6D). Thus, plasminogen bound to PE or to intact bacteria and is converted to active plasmin.

Plasminogen bound to PE cleaves the complement protein C3b

To assay whether plasminogen affects complement action, we assayed the role of PE-bound plasminogen for C3b cleavage. First, plasminogen was bound to immobilized PE; after extensive washing, uPa and C3b were added. After incubation, the reaction mixtures were separated by SDS-PAGE and C3b cleavage was analyzed by Western blotting. Plasminogen activated by uPa cleaved C3b in a time-dependent manner, and three major cleavage fragments of 68, 40, and 30 kDa were identified (Fig. 7A, lanes 1–3). These cleavage fragments were detectable after 1 h, and after 24 h, C3b was completely cleaved (Fig. 7A, lane 4). Similarly, C3b cleavage by plasmin bound to intact bacteria was assayed, and after 1 h of incubation, the same cleavage products were identified (Fig. 7B, lanes 1, 2). Thus, plasminogen bound either to PE or to intact bacteria and when activated by uPa cleaved the human complement protein C3b.

Discussion

In this article, we identify the adhesion protein PE as a novel and major plasminogen-binding protein of NTHi. Plasminogen bound to purified PE and to intact bacteria. In both situations, bound plasminogen was accessible for the activator uPa, and when converted to plasmin cleaved the synthetic chromogenic substrate S-2251 and the natural substrates fibrinogen and C3b. Thus, plasminogen attached to the surface of *H. influenzae* and activated to plasmin allows the pathogen to control complement by degrading C3b, to interact with ECM and to degrade the ECM components like fibrinogen. Plasminogen assists in innate immune control of *Haemophilus*, facilitates bacterial survival in an immunocompetent host, and likely also spreads into deeper tissue layers.

The mechanisms how *H. influenzae* evades host innate immune control, and invades and colonizes host tissue are not completely understood. In this study, we show that *Haemophilus* uses the human plasma protein plasminogen for immune evasion. Plasminogen bound to NTHi 3655 remains inactive, thus demonstrating that *H. influenzae* lacks bacterially encoded plasminogen activators. However, surface-bound plasminogen is accessible for the human activator uPa, which generates active plasmin, and converted plasmin cleaves the synthetic chromogenic substrate and also the natural substrates fibrinogen and C3b. The activation of plasminogen and the activity of plasmin bound to intact bacteria or PE is different due to the binding capacity, sterical situation, and access of the substrates in two different systems.

In the respiratory tract, *H. influenzae* adheres to the mucosal matrix and this step is crucial for pathogenesis (41) *H. influenzae*, similar to other pathogens, expresses surface proteins that are relevant for tissue adherence, complement activation, ECM interaction, and ECM degradation. Both plasminogen and plasminogen activators are present in human lung tissue, thus indicating that acquisition of plasminogen and processing to active plasmin can occur in the respiratory tract and seem relevant for bacterial infection in vivo (42).

Plasminogen bound to NTHi 3655. Because clinical NTHi isolates express the adhesion protein PE, we hypothesized that PE is a plasminogen-binding protein (21). Consequently, binding of plasminogen to recombinant PE, to the PE knockout strain, and to

PE expressed on the surface of *E. coli* was tested. Plasminogen bound to recombinant PE and to PE ectopically expressed on the surface of *E. coli*. Similarly, serum-derived plasminogen also bound to NTHi 3655 and to PE-expressing *E. coli*. In contrast, plasminogen binding to the PE knockout strain was reduced by 65%. Thus, PE is a novel and major plasminogen-binding protein of *H. influenzae*. The interaction both to intact bacteria and to purified PE depends on lysine residues, is ionic strength dependent, and thus resembles the binding features of other pathogen proteins, including *P. aeruginosa* Tuf, *B. burgdorferi* CRASP, and *C. albicans* Gmp1 (33, 37).

PE binds plasminogen and also the terminal complement inhibitor and adhesion protein vitronectin (20). At a physiological level, both human plasma proteins bind to PE. However, vitronectin competes with plasminogen for the free PE binding sites. The N-terminal plasminogen and vitronectin binding regions of the PE protein (i.e., residues 41–68 and 84–108, respectively) are positioned in close vicinity. This close proximity of the major binding sites explains why the two human plasma proteins bind alternatively and why they compete for PE binding.

This competitive effect suggests a role for the two human plasma proteins for complement control (43). The two PE-bound human plasma proteins allow complement control at the C3 level by bound and activated plasmin and inhibition of the terminal pathway by bound vitronectin.

Several pathogenic microbes use human plasminogen for immune evasion (44). In addition to *H. influenzae*, the Gram-negative pathogenic bacteria *B. burgdorferi* (31, 45), *P. aeruginosa* (33), and *H. pylori* (35), the Gram-positive bacteria *S. pneumoniae* (30) and *S. aureus* (46), and also human pathogenic fungi, including *C. albicans* (36, 47) and *A. fumigatus* (48), bind plasminogen. *H. influenzae*, similar to many microbial pathogens, expresses at least two plasminogen binding proteins, PE and aspartase. Thus, *H. influenzae* uses PE protein to acquire human plasminogen and uses surface-attached plasmin for immune and complement escape.

Acknowledgments

We thank the University Hospital in Malmö for support with this project and Marta Brant for skillful and expert technical assistance.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

- Bergmann, S., and S. Hammerschmidt. 2007. Fibrinolysis and host response in bacterial infections. *Thromb. Haemost.* 98: 512–520.
- Ponting, C. P., J. M. Marshall, and S. A. Cederholm-Williams. 1992. Plasminogen: a structural review. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 3: 605–614.
- Sottrop-Jensen, L., M. Zajdel, H. Claeys, T. E. Petersen, and S. Magnusson. 1975. Amino-acid sequence of activation cleavage site in plasminogen: homology with "pro" part of prothrombin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 2577–2581.
- Miyashita, C., E. Wenzel, and M. Heiden. 1988. Plasminogen: a brief introduction into its biochemistry and function. *Haemostasis* 18(Suppl. 1): 7–13.
- Andreasen, P. A., R. Egelund, and H. H. Petersen. 2000. The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. *Cell. Mol. Life Sci.* 57: 25–40.
- Cesarman-Maus, G., and K. A. Hajjar. 2005. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br. J. Haematol.* 129: 307–321.
- Lähteenmäki, K., S. Edelman, and T. K. Korhonen. 2005. Bacterial metastasis: the host plasminogen system in bacterial invasion. *Trends Microbiol.* 13: 79–85.
- Lähteenmäki, K., P. Kuusela, and T. K. Korhonen. 2000. Plasminogen activation in degradation and penetration of extracellular matrices and basement membranes by invasive bacteria. *Methods* 21: 125–132.
- Kluft, C. 2003. The fibrinolytic system and thrombotic tendency. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* 33: 425–429.
- Myöhänen, H., and A. Vaheri. 2004. Regulation and interactions in the activation of cell-associated plasminogen. *Cell. Mol. Life Sci.* 61: 2840–2858.
- Türk, D. C. 1984. The pathogenicity of *Haemophilus influenzae*. *J. Med. Microbiol.* 18: 1–16.

12. Hallström, T., and K. Riesbeck. 2010. *Haemophilus influenzae* and the complement system. *Trends Microbiol.* 18: 258–265.
13. Singh, B., Y. C. Su, and K. Riesbeck. 2010. Vitronectin in bacterial pathogenesis: a host protein used in complement escape and cellular invasion. *Mol. Microbiol.* 78: 545–560.
14. Meats, E., E. J. Feil, S. Stringer, A. J. Cody, R. Goldstein, J. S. Kroll, T. Popovic, and B. G. Spratt. 2003. Characterization of encapsulated and nonencapsulated *Haemophilus influenzae* and determination of phylogenetic relationships by multilocus sequence typing. *J. Clin. Microbiol.* 41: 1623–1636.
15. Watt, J. P., L. J. Wolfson, K. L. O'Brien, E. Henkle, M. Deloria-Knoll, N. McCall, E. Lee, O. S. Levine, R. Hajjeh, K. Mulholland, and T. Cherian; Hib and Pneumococcal Global Burden of Disease Study Team. 2009. Burden of disease caused by *Haemophilus influenzae* type b in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet* 374: 903–911.
16. Jacobs, M. R., R. Dagan, P. C. Appelbaum, and D. J. Burch. 1998. Prevalence of antimicrobial-resistant pathogens in middle ear fluid: multinational study of 917 children with acute otitis media. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 589–595.
17. Wilson, R. 1998. The role of infection in COPD. *Chest* 113(Suppl. 4): 242S–248S.
18. Foxwell, A. R., J. M. Kyd, and A. W. Cripps. 1998. Nontypeable *Haemophilus influenzae*: pathogenesis and prevention. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 294–308.
19. Cripps, A. W., and D. C. Otczyk. 2006. Prospects for a vaccine against otitis media. *Expert Rev. Vaccines* 5: 517–534.
20. Hallström, T., A. M. Blom, P. F. Zipfel, and K. Riesbeck. 2009. Nontypeable *Haemophilus influenzae* protein E binds vitronectin and is important for serum resistance. *J. Immunol.* 183: 2593–2601.
21. Singh, B., M. Brant, M. Kilian, B. Hallström, and K. Riesbeck. 2010. Protein E of *Haemophilus influenzae* is a ubiquitous highly conserved adhesin. *J. Infect. Dis.* 201: 414–419.
22. Ronander, E., M. Brant, E. Eriksson, M. Mörgelin, O. Hallgren, G. Westergren-Thorsson, A. Forsgren, and K. Riesbeck. 2009. Nontypeable *Haemophilus influenzae* adhesin protein E: characterization and biological activity. *J. Infect. Dis.* 199: 522–531.
23. Bresser, P., R. Virkola, M. Jonsson-Vihanne, H. M. Jansen, T. K. Korhonen, and L. van Alphen. 2000. Interaction of clinical isolates of nonencapsulated *Haemophilus influenzae* with mammalian extracellular matrix proteins. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 28: 129–132.
24. St Geme, J. W., III. 2002. Molecular and cellular determinants of non-typeable *Haemophilus influenzae* adherence and invasion. *Cell. Microbiol.* 4: 191–200.
25. Wilson, R., R. Read, and P. Cole. 1992. Interaction of *Haemophilus influenzae* with mucus, cilia, and respiratory epithelium. *J. Infect. Dis.* 165(Suppl. 1): S100–S102.
26. Ullberg, M., I. Karlsson, B. Wiman, and G. Kronvall. 1992. Two types of receptors for human plasminogen on group G streptococci. *APMIS* 100: 21–28.
27. Nitsche-Schmitz, D. P., M. Rohde, and G. S. Chhatwal. 2007. Invasion mechanisms of Gram-positive pathogenic cocci. *Thromb. Haemost.* 98: 488–496.
28. Ullberg, M., G. Kronvall, I. Karlsson, and B. Wiman. 1990. Receptors for human plasminogen on gram-negative bacteria. *Infect. Immun.* 58: 21–25.
29. Sjöström, I., H. Gröndahl, G. Falk, G. Kronvall, and M. Ullberg. 1997. Purification and characterisation of a plasminogen-binding protein from *Haemophilus influenzae*. Sequence determination reveals identity with aspartase. *Biochim. Biophys. Acta* 1324: 182–190.
30. Bergmann, S., M. Rohde, G. S. Chhatwal, and S. Hammerschmidt. 2004. Characterization of plasmin(ogen) binding to *Streptococcus pneumoniae*. *Indian J. Med. Res.* 119(Suppl.): 29–32.
31. Brissette, C. A., K. Haupt, D. Barthel, A. E. Cooley, A. Bowman, C. Skerka, R. Wallich, P. F. Zipfel, P. Kraiczy, and B. Stevenson. 2009. *Borrelia burgdorferi* infection-associated surface proteins ErpP, ErpA, and ErpC bind human plasminogen. *Infect. Immun.* 77: 300–306.
32. Candela, M., S. Bergmann, M. Vici, B. Vitali, S. Turrone, B. J. Eikmanns, S. Hammerschmidt, and P. Brigidi. 2007. Binding of human plasminogen to *Bifidobacterium*. *J. Bacteriol.* 189: 5929–5936.
33. Kunert, A., J. Losse, C. Gruszyn, M. Hühn, K. Kaendler, S. Mikat, D. Volke, R. Hoffmann, T. S. Jokiranta, H. Seeberger, et al. 2007. Immune evasion of the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*: elongation factor Tuf is a factor H and plasminogen binding protein. *J. Immunol.* 179: 2979–2988.
34. Lähdenmäki, K., P. Kuusela, and T. K. Korhonen. 2001. Bacterial plasminogen activators and receptors. *FEMS Microbiol. Rev.* 25: 531–552.
35. Ljungh, A. 2000. *Helicobacter pylori* interactions with plasminogen. *Methods* 21: 151–157.
36. Luo, S., S. Poltermann, A. Kunert, S. Rupp, and P. F. Zipfel. 2009. Immune evasion of the human pathogenic yeast *Candida albicans*: Pra1 is a Factor H, FHL-1 and plasminogen binding surface protein. *Mol. Immunol.* 47: 541–550.
37. Poltermann, S., A. Kunert, M. von der Heide, R. Eck, A. Hartmann, and P. F. Zipfel. 2007. Gpm1p is a factor H-, FHL-1-, and plasminogen-binding surface protein of *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* 282: 37537–37544.
38. Xolalpa, W., A. J. Vallecillo, M. Lara, G. Mendoza-Hernandez, M. Comini, R. Spallek, M. Singh, and C. Espitia. 2007. Identification of novel bacterial plasminogen-binding proteins in the human pathogen *Mycobacterium tuberculosis*. *Proteomics* 7: 3332–3341.
39. Wallich, R., J. Pattathu, V. Kitaritschky, C. Brenner, P. F. Zipfel, V. Brade, M. M. Simon, and P. Kraiczy. 2005. Identification and functional characterization of complement regulator-acquiring surface protein 1 of the Lyme disease spirochetes *Borrelia afzelii* and *Borrelia garinii*. *Infect. Immun.* 73: 2351–2359.
40. Decker, E. L., C. Skerka, and P. F. Zipfel. 1998. The early growth response protein (EGR-1) regulates interleukin-2 transcription by synergistic interaction with the nuclear factor of activated T cells. *J. Biol. Chem.* 273: 26923–26930.
41. Murphy, T. F., J. M. Bernstein, D. M. Dryja, A. A. Campagnari, and M. A. Apicella. 1987. Outer membrane protein and lipooligosaccharide analysis of paired nasopharyngeal and middle ear isolates in otitis media due to nontypeable *Haemophilus influenzae*: pathogenic and epidemiological observations. *J. Infect. Dis.* 156: 723–731.
42. Angelici, E., C. Contini, M. Spezzano, R. Romani, P. Carfagna, P. Serra, and R. Canipari. 2001. Plasminogen activator production in a rat model of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Microbiol. Immunol.* 45: 605–611.
43. Hallström, T., E. Trajkovska, A. Forsgren, and K. Riesbeck. 2006. *Haemophilus influenzae* surface fibrils contribute to serum resistance by interacting with vitronectin. *J. Immunol.* 177: 430–436.
44. Zipfel, P. F., R. Würzner, and C. Skerka. 2007. Complement evasion of pathogens: common strategies are shared by diverse organisms. *Mol. Immunol.* 44: 3850–3857.
45. Hartmann, K., C. Corvey, C. Skerka, M. Kirschfink, M. Karas, V. Brade, J. C. Miller, B. Stevenson, R. Wallich, P. F. Zipfel, and P. Kraiczy. 2006. Functional characterization of BbCRASP-2, a distinct outer membrane protein of *Borrelia burgdorferi* that binds host complement regulators factor H and FHL-1. *Mol. Microbiol.* 61: 1220–1236.
46. Beaufort, N., P. Wojciechowski, C. P. Sommerhoff, G. Szmyd, G. Dubin, S. Eick, J. Kellermann, M. Schmitt, J. Potempa, and V. Magdolen. 2008. The human fibrinolytic system is a target for the staphylococcal metalloprotease aureolysin. *Biochem. J.* 410: 157–165.
47. Luo, S., A. Hartmann, H. M. Dahse, C. Skerka, and P. F. Zipfel. 2010. Secreted pH-regulated antigen 1 of *Candida albicans* blocks activation and conversion of complement C3. *J. Immunol.* 185: 2164–2173.
48. Behnsen, J., A. Hartmann, J. Schmalzer, A. Gehrke, A. A. Brakhage, and P. F. Zipfel. 2008. The opportunistic human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* evades the host complement system. *Infect. Immun.* 76: 820–827.

4.2. Manuskript 2: *Borrelia burgdorferi* Infection-Associated Surface Proteins ErpP, ErpA and ErpC Bind Human Plasminogen

INFECTION AND IMMUNITY, Jan. 2009, p. 300–306
0019-9567/09/\$08.00+0 doi:10.1128/IAI.01133-08
Copyright © 2009, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 77, No. 1

Borrelia burgdorferi Infection-Associated Surface Proteins ErpP, ErpA, and ErpC Bind Human Plasminogen[†]

Catherine A. Brissette,^{1,†*} Katrin Haupt,^{2,†} Diana Barthel,² Anne E. Cooley,^{1,‡} Amy Bowman,¹ Christina Skerka,² Reinhard Wallich,³ Peter F. Zipfel,^{2,4} Peter Kraiczy,⁵ and Brian Stevenson¹

Department of Microbiology, Immunology, and Molecular Genetics, University of Kentucky, Lexington, Kentucky¹;
Leibniz Institute for Natural Product Research, Jena, Germany²; University of Heidelberg, Heidelberg, Germany³; Friedrich Schiller University, Jena, Germany⁴; and Institute of Medical Microbiology and Infection Control, University Hospital of Frankfurt, Frankfurt am Main, Germany⁵

Received 10 September 2008/Returned for modification 24 October 2008/Accepted 30 October 2008

Host-derived plasmin plays a critical role in mammalian infection by *Borrelia burgdorferi*. The Lyme disease spirochete expresses several plasminogen-binding proteins. Bound plasminogen is converted to the serine protease plasmin and thereby may facilitate the bacterium's dissemination throughout the host by degrading extracellular matrix. In this work, we demonstrate plasminogen binding by three highly similar borrelial outer surface proteins, ErpP, ErpA, and ErpC, all of which are expressed during mammalian infection. Extensive characterization of ErpP demonstrated that this protein bound in a dose-dependent manner to lysine binding site I of plasminogen. Removal of three lysine residues from the carboxy terminus of ErpP significantly reduced binding of plasminogen, and the presence of a lysine analog, ϵ -aminocaproic acid, inhibited the ErpP-plasminogen interaction, thus strongly pointing to a primary role for lysine residues in plasminogen binding. Ionic interactions are not required in ErpP binding of plasminogen, as addition of excess NaCl or the polyanion heparin did not have any significant effect on binding. Plasminogen bound to ErpP could be converted to the active enzyme, plasmin. The three plasminogen-binding Erp proteins can also bind the host complement regulator factor H. Plasminogen and factor H bound simultaneously and did not compete for binding to ErpP, indicating separate binding sites for both host ligands and the ability of the borrelial surface proteins to bind both host proteins.

Lyme disease is the most commonly reported arthropod-borne disease in the United States (8). *Borrelia burgdorferi*, the causative agent of Lyme disease, is transmitted to its hosts through the bites of infected *Ixodes* ticks. In the earliest stage of Lyme disease, a bull's-eye-shaped rash, erythema migrans, occurs as the spirochete spreads outward from the site of the tick bite. If left untreated, serious clinical outcomes can occur, including arthritis, neuropathies, and carditis (48).

The bacterium disseminates from the bite site to other host tissues. *B. burgdorferi* can traverse the epithelium and invade vascular walls but is rarely abundant in blood (1). In addition, *B. burgdorferi* can pass through the blood-brain barrier to enter the central nervous system (58). The spirochete, unlike many invasive pathogens, lacks surface protease activities (12, 26). Therefore, binding of host proteases to the surface of the bacterium may aid in the spirochete's dissemination. Indeed, *B. burgdorferi* binds plasminogen, a component of the host's fibrinolytic system (12, 19). Plasminogen circulates in the plasma as an inactive proenzyme and is activated by tissue-type plasminogen activator and urokinase-type plasminogen activa-

tor (uPA) to plasmin (55). Plasminogen binding is an important virulence factor for invasive pathogens such as group A streptococci and *Staphylococcus*, as well as *Borrelia* species (10, 43, 55). The binding of plasminogen to bacteria and its subsequent activation allow bacteria to degrade the host's extracellular matrix and basement membranes either through the direct protease activity of plasmin or by plasmin's activation of host matrix metalloproteases (MMPs). *B. burgdorferi* has previously been shown to bind plasminogen, which is rapidly converted to active plasmin in the presence of host plasminogen activator (11). In vitro, plasmin-coated *B. burgdorferi* is able to penetrate endothelial cell monolayers (12). Surface-associated plasmin on *B. burgdorferi* can directly degrade fibronectin, a major component of the extracellular matrix, as well as laminin and vitronectin (11, 19). *B. burgdorferi* induces the release of MMP-9 (gelatinase) and MMP-1 (collagenase) from human cells, and plasmin-coated *B. burgdorferi* activates pro-MMP-9 (20), initiating a cascade that leads to degradation of basement membranes. Plasminogen has previously been shown to be important in *B. burgdorferi* pathogenesis. Although not strictly required for infection, plasminogen was required for efficient dissemination in ticks, and its absence decreased spirochetemia in plasminogen-deficient mice (10).

Plasminogen-binding proteins of *B. burgdorferi* have previously been identified, including the outer-surface lipoprotein OspA (19). A role for OspC in plasminogen binding has also been suggested (31). However, OspA is generally not expressed during human infection, and OspC production ceases within the first few days of mammalian infection (13, 24, 25, 34,

* Corresponding author. Mailing address: Department of Microbiology, Immunology, and Molecular Genetics, University of Kentucky College of Medicine, MN 469, W. R. Willard Medical Education Building, Lexington, KY 40536-0298. Phone: (859) 257-9305. Fax: (859) 257-8994. E-mail: catherine.brissette@uky.edu.

† C.A.B. and K.H. contributed equally to this work.

‡ Present address: Department of Surgery, Feinberg School of Medicine, Northwestern University, Chicago, IL 60611.

[†] Published ahead of print on 10 November 2008.

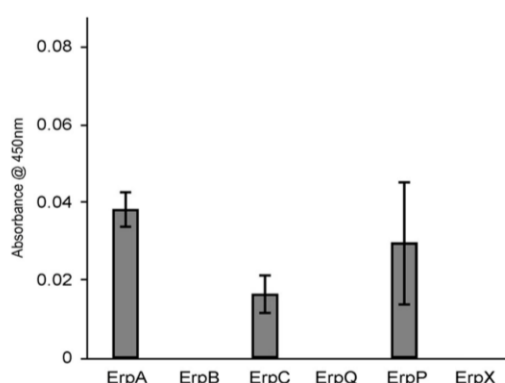


FIG. 1. ErpA, ErpC, and ErpP bind plasminogen. Binding of plasminogen (25 μ g/ml) to immobilized Erp proteins (10 μ g/ml) was analyzed by ELISA, with bound plasminogen detected using specific antiserum. BSA was used as a negative control for nonspecific binding. Values represent plasminogen binding to each Erp protein minus background absorbance for BSA. Data represent the means and standard errors from two separate experiments with six replicates per Erp protein.

42). Other, unidentified plasminogen-binding proteins have been observed in *B. burgdorferi*, including a protein(s) with an approximate molecular mass of 20 kDa, which is close to the size of several Erp proteins (12, 19). The members of the Erp family of outer-surface lipoproteins are expressed at high levels during mammalian infection (15, 23, 38–41).

Lyme disease spirochetes contain numerous DNA elements, including the main chromosome as well as linear and circular plasmids (6). Infectious isolates carry several distinct yet homologous elements called cp32s, circular prophages of approximately 32 kb (54). All cp32 elements encode one or two Erp proteins, which can vary widely in amino acid sequence (50). However, all *erp* loci are preceded by nearly identical promoter regions (36, 53). Hence, most of the *erp* genes analyzed follow the same pattern of expression, being repressed in the tick vector but synthesized during mammalian infection (15, 21, 23, 35, 37–41). Roles for most of the Erp proteins have yet to be defined. ErpX has been demonstrated to bind host laminin (our unpublished results and reference 3). Three Erp proteins bind the host complement regulator factor H and factor H-related protein 1: ErpP, ErpC, and ErpA (22, 28, 29). Some factor H binding proteins of other human pathogens have been demonstrated to bind multiple ligands, including plasminogen (30, 47). These data, and the presence of unidentified plasminogen-binding proteins in *B. burgdorferi*, prompted us to examine if Erp proteins are able to bind plasminogen.

MATERIALS AND METHODS

Bacteria. An infectious clone of the sequenced type strain, *B. burgdorferi* B31-MI-16 (5, 18), which retains all plasmids (40), was grown at 34°C to cell densities of approximately 1×10^7 ml in modified Barbour-Stoenner-Kelly medium as described previously (59). Total DNA (genomic and plasmids) was isolated using the DNeasy blood and tissue kit (Qiagen, Valencia, CA) according to the manufacturer's instructions.

Recombinant proteins. Polyhistidine-tagged, full-length ErpA, ErpC, and ErpP have been described previously (17, 49). All recombinant proteins contained amino-terminal tags, with the Erp segment beginning with that protein's first amino acid following the cysteine lipidation site. A recombinant plasmid encoding carboxy-terminally truncated ErpP was produced by PCR of *B. burgdorferi* B31-MI-16 DNA using primers RERPP-1 (5'-CACCAAAATTCATAC TTCATATGATGAG-3') and RERPP-4 (5'-TTATTAACCACTTCTAGTGG TATTGCATATTGAG-3') and insertion into pET200 (Invitrogen, Carlsbad, CA). The resultant plasmid's insert was entirely sequenced on both strands to ensure that no undesired mutations had occurred during PCR or cloning procedures.

Recombinant proteins were expressed in *Escherichia coli* Rosetta (DE3)pLysS (Novagen, Madison, WI), upon induction with isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG). Induced *E. coli* cells were harvested and then lysed by sonication in a mixture of 30 mM imidazole, 0.5 M NaCl, and 20 mM NaPO₄ (pH 7.4), and debris was cleared by centrifugation. Recombinant proteins were purified from cleared lysates using MagneHis nickel-conjugated magnetic beads (Promega, Madison, WI) or by His-Trap HP columns and an ÄKTA fast protein liquid chromatograph equipped with a UPC-900 UV absorbance monitor and a Frac920 fraction collector (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Proteins were eluted from fast protein liquid chromatography columns by a constantly increasing gradient between the lysis buffer and 0.75 M imidazole, 20 mM NaPO₄, and 5 M NaCl (pH 7.4). All recombinant proteins were dialyzed overnight against phosphate-buffered saline (PBS) using 3,500-molecular-weight-cutoff Slide-A-Lyzer cassettes (Pierce, Rockford, IL) at 4°C. Protein purity was assessed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis followed by staining with Coomassie brilliant blue. Protein concentrations were determined by bicinchoninic acid protein assays (Pierce).

ELISA. For the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Maxisorp 96-well plates (Nalge-Nunc, Rochester, NY) were coated overnight with 10 μ g/ml human plasminogen (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 10 μ g/ml recombinant Erp protein, or 10 μ g/ml bovine serum albumin (BSA [negative control]) in PBS at 4°C. Plates were brought to room temperature and washed once with PBS supplemented with 0.05% (vol/vol) Tween 20 (PBS-T). Wells were blocked for 2 h at room temperature with PBS with 1% (mass/vol) gelatin and then washed three times with PBS-T. Afterwards, 100 μ l/well of either recombinant Erp protein, plasminogen (Sigma-Aldrich), or factor H (Sigma-Aldrich [see text for concentrations]) was added and incubated for 2 h at 37°C. Wells were washed three times with PBS-T and then incubated for 1 h at room temperature with rabbit antiserum raised against *B. burgdorferi* ErpA (which cross-reacts with the highly similar ErpP and ErpC), diluted 1:500 in PBS, or goat anti-human plasminogen (Novus Biologicals, Littleton, CO) or goat anti-human factor H (Calbiochem, San Diego, CA). Plates were washed three times with PBS-T, and then wells were incubated for 1 h at room temperature with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit immunoglobulin G (IgG) or horseradish peroxidase-conjugated protein A (GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom), diluted 1:5,000. Wells were again washed three times with PBS-T, 100 μ l/well tetramethylbenzidine substrate was added, and then reactions were stopped by addition of 100 μ l/well of 2 N H₂SO₄. Absorbance was read at 450 nm using a Spectramax plate reader using SoftMax Pro software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

For experiments examining the role of ionic interactions in ErpP binding to plasminogen, increasing concentrations of NaCl were added to the PBS-based binding buffer with ErpP. For experiments analyzing the role of heparin-binding domains in the ErpP-plasminogen interaction, porcine heparin (final concentra-

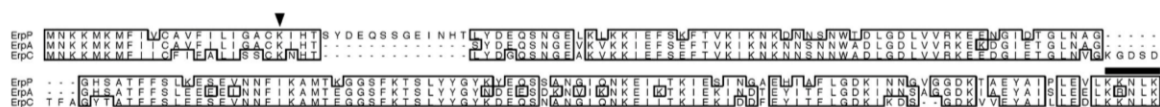


FIG. 2. Alignment of ErpP, ErpA, and ErpC. Identical amino acid residues found in two or more of the proteins are boxed and shaded. The five amino acids deleted from the truncated ErpP used in this work are indicated by a thick line over the sequence. The black arrowhead indicates the first amino acid following the polyhistidine tag in the recombinant Erp protein.

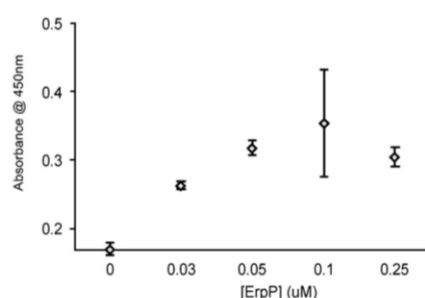


FIG. 3. ErpP binds plasminogen in a dose-dependent manner. Binding of ErpP (0 to 1 μ M) to immobilized plasminogen (10 μ g/ml) was analyzed by ELISA, with bound ErpP detected using polyclonal rabbit antiserum. BSA was used as a negative control for nonspecific binding. Values represent ErpP binding to plasminogen minus background absorbance for BSA. Data represent the means and standard errors from two separate experiments with six replicates per concentration of ErpP.

tions, 0 to 50 μ M [Sigma-Aldrich]) was added to the plasminogen-coated wells for 1 h prior to the addition of tested protein and was also included in the binding buffer along with the tested recombinant protein (51). To determine the role of lysines in plasminogen-ErpP interaction, the lysine analog ϵ -aminocaproic acid (final concentration, 1 mM [Sigma-Aldrich]) was added with plasminogen to ErpP-coated wells. The role of Kringle domains of plasminogen in ErpP binding was assessed using plasminogen lysine-binding site I (LBS I)-coated wells (Sigma-Aldrich).

Protein binding affinities (K_d) were calculated as that concentration of ligand required for half-maximal binding activity.

Plasminogen activation assay. Maxisorp 96-well plates (Nalge-Nunc) were coated overnight with 10 μ g/ml recombinant ErpP or 10 μ g/ml BSA in PBS at 4°C. Plates were brought to room temperature and washed once with PBS-T. Wells were blocked for 2 h at room temperature with PBS with 2% (mass/vol) BSA and then washed three times with PBS-T. Afterwards 100 μ l/well of 10 μ g/ml human plasminogen was added and incubated for 2 h at 37°C. Wells were washed three times with PBS-T, and then 4 ng/well of human uPA (Chemicon, Temecula, CA) was added. Next, the plasmin-specific substrate *D*-valyl-leucyl-lysine-*p*-nitroanilide dihydrochloride (Sigma-Aldrich) was added at a final concentration of 0.3 mM in 64 mM Tris, 350 mM NaCl, 0.15% Triton X-100 (pH 7.5). Plates were incubated overnight at 37°C, and absorbance was read at 405 nm.

RESULTS

ErpP, ErpA, and ErpC bind human plasminogen. Earlier observations that *B. burgdorferi* expresses plasminogen-binding surface proteins of approximate masses of 20 kDa (12, 19, 31), similar to some Erp proteins, prompted us to investigate whether Erp proteins were capable of binding human plasminogen. Several Erp proteins from type strain B31 having diverse sequences were chosen for study (5, 49, 52). Recombinant ErpA, ErpB, ErpC, ErpP, ErpQ, and ErpX, and the nonspecific negative control BSA were individually immobilized onto microtiter plates and incubated with human plasminogen, and their abilities to form protein complexes were measured by ELISA. Significant binding of plasminogen was detected only for ErpA, ErpC, and ErpP (Fig. 1). These three proteins are >98% identical and all have molecular masses of 19 to 21 kDa (Fig. 2). Due to those extensive similarities, ErpP was chosen as a representative protein for additional characterization.

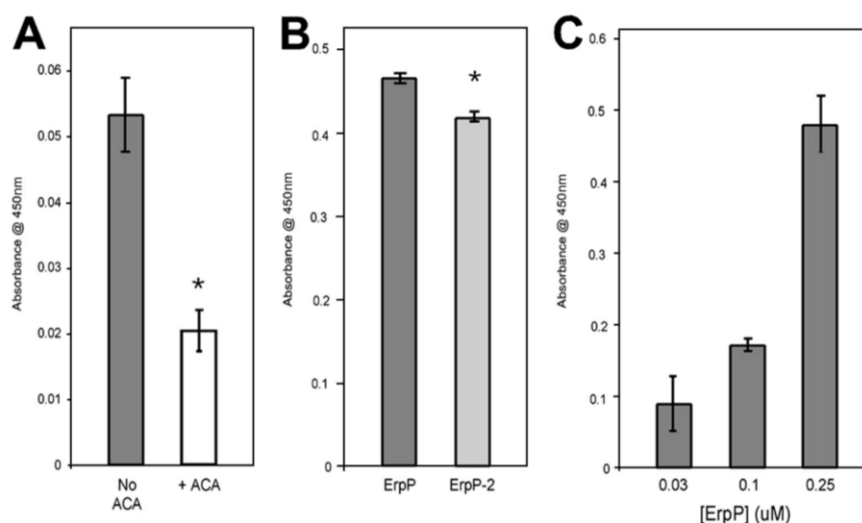


FIG. 4. Role of lysines in ErpP plasminogen binding activity. Binding of plasminogen to immobilized ErpP (10 μ g/ml) was analyzed by ELISA. (A) Plasminogen (25 μ g/ml) was added to ErpP-coated wells in the presence or absence of 1 mM ϵ -aminocaproic acid (ACA). Bound plasminogen was detected using a specific antiserum. BSA was used as a negative control. Data represent the means and standard errors from two separate experiments with 12 replicates per condition. *, $P < 0.001$, Student's t test assuming unequal variances. (B) Binding of plasminogen to immobilized ErpP and the carboxy-terminal truncation mutant (rErpP2) was analyzed by ELISA. Plasminogen (25 μ g/ml) was added to ErpP-coated wells. Bound plasminogen was detected using a specific antiserum. BSA was used as a negative control. Data represent the means and standard errors from two separate experiments with 12 replicates per condition. *, $P < 0.001$, Student's t test assuming unequal variances. (C) Binding of ErpP (0 to 250 nM) to immobilized LBS I of plasminogen analyzed by ELISA. Bound ErpP was detected using a specific antiserum. BSA was used as a negative control. Data represent the means and standard errors from two separate experiments with six replicates per concentration of ErpP.

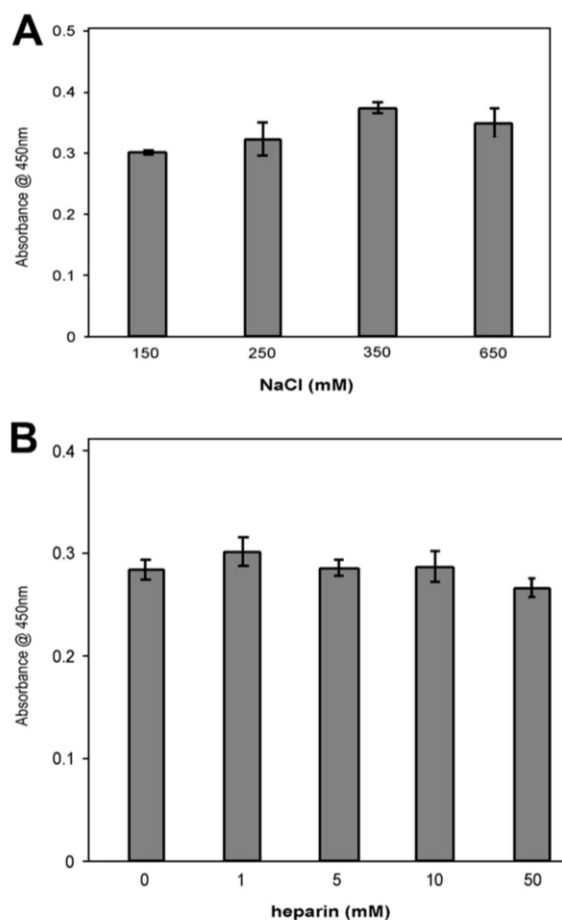


FIG. 5. Role of ionic interactions in ErpP binding of plasminogen. Binding of plasminogen to immobilized ErpP (10 μ g/ml) was analyzed by ELISA. (A) Plasminogen (25 μ g/ml) was incubated in the presence of increasing concentrations of NaCl. Bound plasminogen was detected using a specific antiserum. BSA was used as a negative control. Data represent the means and standard errors from two experiments with six replicates per concentration of NaCl. (B) Heparin (0 to 50 μ M) was added to immobilized ErpP for 1 h prior to the addition of plasminogen. After a single wash with PBS-T, plasminogen (25 μ g/ml) was incubated in the presence of heparin (0 to 50 μ M). Bound plasminogen was detected using a specific antiserum. BSA was used as a negative control. Data represent the means and standard errors from two experiments with six replicates per concentration of heparin.

Analyses using various concentrations of plasminogen demonstrated that ErpP bound plasminogen in a dose-dependent manner, with a K_d of approximately 25 nM (Fig. 3).

Role of lysines in ErpP plasminogen binding activity. Plasminogen receptors on the surface of host cells bind plasminogen through lysine residues present in Kringle domains, and several bacterial proteins contain lysine residues that are important for the binding of plasminogen (2, 11, 33, 45). ErpP, ErpA, and ErpC are each comprised of approximately 13% lysine residues (24 out of 186 amino acids in ErpP [Fig. 2]). Addition of the synthetic lysine analog ϵ -aminocaproic acid

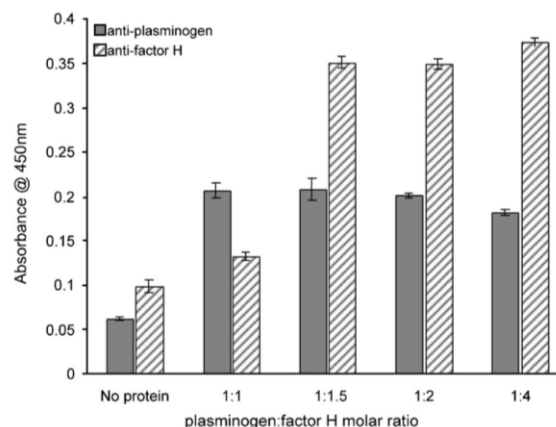


FIG. 6. Factor H and plasminogen do not compete for binding to ErpP. Plasminogen (200 nM) binding to immobilized ErpP (10 μ g/ml) was assayed in the presence of increasing concentrations of factor H. Both serum proteins were detected by individual, specific antisera. In normal human serum, the molar ratio of plasminogen to factor H is 1:1.4. Data represent the means and standard errors from two different experiments with six replicates per condition.

significantly reduced the ErpP-plasminogen interaction, indicating a role for lysines in ErpP binding to the ligand (Fig. 4A).

Previous studies found that the three carboxy-terminal lysine residues of ErpP are essential for that protein to interact with human complement regulator factor H (29). In addition, the carboxy-terminal lysine residues of some bacterial plasminogen-binding proteins are necessary for plasminogen binding (4, 44). To ascertain the importance of the carboxy-terminal lysines in ErpP binding to plasminogen, a truncated ErpP protein lacking five amino acids at the carboxy terminus was engineered (Fig. 2). Deletion of the carboxy-terminal lysines significantly reduced, but did not completely eliminate, binding of plasminogen to ErpP. Thus, the carboxy terminus of ErpP is involved in plasminogen binding, but apparently so are some or all of ErpP's other 21 lysine residues (Fig. 4B).

Next, the ability of ErpP to interact with the lysine-binding sites of plasminogen was tested. A fragment of plasminogen which contains the first three triple-loop structures in the plasmin A chain (Kringle 1 + 2 + 3), plasminogen LBS I, was used as ligand. ErpP bound LBS I in a dose-dependent manner, again pointing to a role for the lysines of ErpP in the binding of plasminogen (Fig. 4C).

Role of ionic interactions in ErpP binding to plasminogen. ErpP contains a large number of charged amino acids (Fig. 2), with a theoretical pI of 8.36. To assess the role of ionic interactions in ErpP plasminogen binding, binding assays were performed in the presence of various concentrations of NaCl or the polyanion heparin. NaCl, at up to four times the physiological concentration, did not have any significant effects on plasminogen binding (Fig. 5A). Likewise, heparin had no appreciable effect on ErpP-plasminogen interactions (Fig. 5B). These data suggest that ionic interactions are dispensable for plasminogen-ErpP interactions.

Factor H and plasminogen do not compete for binding to ErpP. Purified ErpP, ErpA, and ErpC can also bind the human

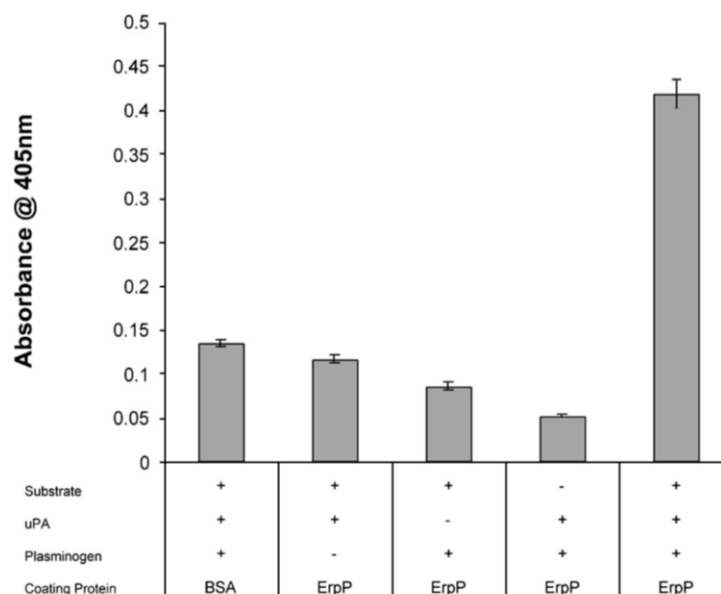


FIG. 7. ErpP-bound plasminogen is converted into plasmin. ErpP-coated wells of microtiter plates were incubated with plasminogen, urokinase (uPA), and/or a plasmin-specific chromogenic substrate. Proteolytic activity was measured by absorbance at 450 nM. Data represent the means and standard errors from two different experiments with six replicates per condition.

complement regulator factor H. The deletion of nine residues of the carboxy terminus of ErpP, which contains three lysines, abrogates factor H binding (29). As described above, deletion of the same three lysine residues significantly impaired ErpP binding of plasminogen. To assess if factor H and plasminogen share identical or overlapping binding sites on ErpP, binding of plasminogen by full-length ErpP was assayed in the presence of increasing concentrations of factor H. In normal human sera, the molar ratio of plasminogen to factor H is 1:1.4. At experimental ratios of up to 1:4, no competition between plasminogen and factor H for ErpP binding was observed (Fig. 6). These data suggest that plasminogen and factor H bind to separate sites of ErpP and demonstrate that the two host proteins can adhere to ErpP simultaneously.

Plasminogen bound to ErpP can be converted to plasmin. Plasminogen bound to the surface of *B. burgdorferi* can be converted to plasmin (19). To determine if ErpP-bound plasminogen can similarly be activated, multiwell plates were coated with ErpP, blocked, and then incubated with plasminogen. uPA was added, and the proteolytic activity was quantified using a plasmin-specific chromogenic substrate. As shown in Fig. 7, ErpP-bound plasminogen was converted to plasmin. These data demonstrate that Erp-bound plasminogen is accessible to activators and can be converted into the active enzyme.

DISCUSSION

Binding of plasminogen to the surface of bacteria is often important for virulence, both by providing a means of initial anchoring to endothelium via host plasminogen receptors and by adding a potent protease activity to the bacterial surface. Activation of plasmin on the surface of pathogens can there-

fore facilitate extracellular matrix degradation, allowing the pathogen to disseminate throughout the host. Plasminogen has previously been shown to be important for *B. burgdorferi* dissemination in both vector ticks and mammalian hosts (10). Plasminogen is also important in kidney and brain invasion by a related spirochete, *Borrelia crocidurae* (43). Multiple plasminogen-binding proteins are present in Lyme disease spirochetes, as demonstrated by plasminogen overlay assays, but only a few have been identified and characterized. Of these, OspA is generally not produced during human infection, and OspC is only transiently expressed during transmission from ticks to mammals (13, 24, 25, 35, 42, 56). In the present study, we identified three members of the polymorphic Erp protein family, ErpP, ErpA, and ErpC, as being plasminogen-binding proteins. Those Erp proteins are known to be produced through all stages of mammalian infection (15, 35, 37–41), and therefore acquisition of plasminogen by ErpP, ErpA, and ErpC may play a role(s) in long-term infection.

Plasminogen interacts with its substrates, inhibitors, and effectors through five Kringle domains (7). These approximately 80-amino-acid loop structures are linked by triple-disulfide bonds and undergo conformational change upon binding to lysine-containing sequences. This conformational change allows plasminogen to achieve a form that is easily activated and protected from plasmin inhibitors (32). A number of bacterial proteins contain lysine residues that are crucial for the binding of plasminogen (2, 11, 33). In the present study, we demonstrated that lysine residues in ErpP are directly involved in plasminogen binding, as the lysine analog ϵ -aminocaproic acid significantly inhibited binding of ErpP to plasminogen. Deletion of the three carboxy-terminal lysine residues also de-

creased ligand binding. In addition, ErpP bound the LBS I (Kring domains 1 to 3) of plasminogen in a dose-dependent manner. Most of the Erp proteins contain high percentages of lysine residues, yet only ErpP, ErpA, and ErpC bind plasminogen. Intriguingly, addition of anions (Cl^- , heparin) did not affect ErpP-plasminogen interactions, suggesting that non-charged amino acids and/or protein conformations are also important for binding. Indeed, internal binding motifs flanked by hydrophobic residues are involved in plasminogen binding by enolases from *Streptococcus pneumoniae* and *Neisseria meningitidis* (16, 27).

Beyond its role in degradation of basement membranes and the facilitation of dissemination to diverse tissues in the host, plasminogen binding by *B. burgdorferi* might be involved in immune avoidance. The acquired proteolytic activity of plasmin may degrade specific antibodies and components of the complement system. For example, staphylokinase of *Staphylococcus aureus* exhibits antiopsonic activity by binding plasminogen. The subsequent protease activity of plasmin degrades the opsonins C3b and IgG (46). Some plasminogen-binding proteins are also immunosuppressive, such as enolase of *Streptococcus sobrinus*, which increases interleukin-10 production and dampens immune responses in mice (57).

ErpP also binds factor H, the key regulator of the alternative pathway of complement. ErpP appears to bind factor H and plasminogen through discrete domains, as factor H did not compete with plasminogen for binding to ErpP. This echoes the dual function of the unrelated CRASP-1_{BH}/FhbA protein of *Borrelia hermsii*, which likewise binds factor H and plasminogen through separate regions (47). Another example of a dual-function protein that binds multiple serum components is Tuf of *Pseudomonas aeruginosa*. However, unlike ErpP, Tuf shares similar or overlapping binding sites for factor H and plasminogen (30). The carboxy-terminal lysine residues of ErpP are essential for binding to factor H and are important for binding to plasminogen. Yet the absence of competition for ErpP suggests that the two ligands use multiple contact points for binding of factor H and/or plasminogen. While the significance of binding multiple serum components remains to be defined, many bacterial adhesins have multiple binding partners (9, 14). An obvious advantage to the spirochete would be that fewer surface lipoproteins need to be expressed in order to disseminate and evade host immune responses, conserving energy and allowing *B. burgdorferi* to safely and swiftly transition from blood to tissues. The combination of plasminogen and factor H binding to the same proteins suggests a rather sophisticated escape mechanism of *B. burgdorferi* for dissemination and persistence in the mammalian host.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by NIAID grant A144254 to B. Stevenson and Deutsche Forschungsgemeinschaft grant Kr3383/1 to P. Kraiczy.

We thank Logan Burns, Sean Riley, Ashutosh Verma, Erin Welsh, and Michael Woodman for helpful comments and technical assistance.

REFERENCES

- Barbour, A. G., and S. F. Hayes. 1986. Biology of *Borrelia* species. Microbiol. Rev. 50:381–400.
- Boyle, M. D., and R. Lottenberg. 1997. Plasminogen activation by invasive human pathogens. Thromb. Haemost. 77:1–10.
- Brisette, C. A., A. E. Cooley, L. H. Burns, S. P. Riley, A. Verma, M. E. Woodman, T. Bykowski, and B. Stevenson. 2008. Lyme borreliosis spirochete Erp proteins, their known host ligands, and potential roles in mammalian infection. Int. J. Med. Microbiol. 298(Suppl. 1):257–267.
- Broder, C. C., R. Lottenberg, G. O. von Mering, K. H. Johnston, and M. D. Boyle. 1991. Isolation of a prokaryotic plasmin receptor. Relationship to a plasminogen activator produced by the same micro-organism. J. Biol. Chem. 266:4922–4928.
- Casjens, S., N. Palmer, R. van Vugt, W. M. Huang, B. Stevenson, P. Rosa, R. Lathigra, G. Sutton, J. Peterson, R. J. Dodson, D. Haft, E. Hickey, M. Gwinn, O. White, and C. Fraser. 2000. A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs of an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. Mol. Microbiol. 35:490–516.
- Casjens, S. R., W. M. Huang, E. B. Gilcrease, W. Qiu, W. D. McCaig, B. J. Luft, S. E. Schutzer, and C. M. Fraser. 2006. Comparative genomics of *Borrelia burgdorferi*, p. 79–95. In F. C. Cabello, D. Hulska, and H. P. Godfrey (ed.), Molecular biology of spirochetes. IOS Press, Amsterdam, The Netherlands.
- Castellino, F. J., and S. G. McCance. 1997. The kringle domains of human plasminogen. Ciba Found. Symp. 212:46–65.
- CDC. 2007. Lyme disease—United States, 2003–2005. MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep. 56:573–576.
- Coburn, J., J. R. Fischer, and J. M. Leong. 2005. Solving a sticky problem: new genetic approaches to host cell adhesion by the Lyme disease spirochete. Mol. Microbiol. 57:1182–1195.
- Coleman, J. L., J. A. Gebbia, J. Piesman, J. L. Degen, T. H. Bugge, and J. L. Benach. 1997. Plasminogen is required for efficient dissemination of *B. burgdorferi* in ticks and for enhancement of spirochetemia in mice. Cell 89:1111–1119.
- Coleman, J. L., E. J. Roemer, and J. L. Benach. 1999. Plasmin-coated *Borrelia burgdorferi* degrades soluble and insoluble components of the mammalian extracellular matrix. Infect. Immun. 67:3929–3936.
- Coleman, J. L., T. J. Sellati, J. E. Testa, R. R. Kew, M. B. Furie, and J. L. Benach. 1995. *Borrelia burgdorferi* binds plasminogen, resulting in enhanced penetration of endothelial monolayers. Infect. Immun. 63:2478–2484.
- Crother, T. R., C. I. Champion, J. P. Whitelegge, R. Aguilera, X.-Y. Wu, D. R. Blanco, J. N. Miller, and M. A. Lovett. 2004. Temporal analysis of the antigenic composition of *Borrelia burgdorferi* during infection in rabbit skin. Infect. Immun. 72:5063–5072.
- Cunningham, M. W. 2000. Pathogenesis of group A streptococcal infections. Clin. Microbiol. Rev. 13:470–511.
- Das, S., S. W. Barthold, S. Stocker Giles, R. R. Montgomery, S. R. Telford, and E. Fikrig. 1997. Temporal pattern of *Borrelia burgdorferi* p21 expression in ticks and the mammalian host. J. Clin. Invest. 99:987–995.
- Ehinger, S., W. D. Schubert, S. Bergmann, S. Hammerschmidt, and D. W. Heinz. 2004. Plasmin(ogen)-binding alpha-enolase from *Streptococcus pneumoniae*: crystal structure and evaluation of plasmin(ogen)-binding sites. J. Mol. Biol. 343:997–1005.
- El-Hage, N., K. Babb, J. A. Carroll, N. Lindstrom, E. R. Fischer, J. C. Miller, R. D. Gilmore, Jr., M. L. Mbow, and B. Stevenson. 2001. Surface exposure and protease insensitivity of *Borrelia burgdorferi* Erp (OspEF-related) lipoproteins. Microbiology 147:821–830.
- Fraser, C. M., S. Casjens, W. M. Huang, G. G. Sutton, R. Clayton, R. Lathigra, O. White, K. A. Ketchum, R. Dodson, E. K. Hickey, M. Gwinn, B. Dougherty, J.-F. Tomb, R. D. Fleischmann, D. Richardson, J. Peterson, A. R. Kerlavage, J. Quackenbush, S. Salzberg, M. Hanson, R. van Vugt, N. Palmer, M. D. Adams, J. Gocayne, J. Weidmann, T. Utterback, L. Watthey, L. McDonald, P. Artiach, C. Bowman, S. Garland, C. Fujii, M. D. Cotton, K. Horst, K. Roberts, B. Hatch, H. O. Smith, and J. C. Venter. 1997. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. Nature 390:580–586.
- Fuchs, H., R. Wallich, M. M. Simon, and M. D. Kramer. 1994. The outer surface protein A of the spirochete *Borrelia burgdorferi* is a plasmin(ogen) receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:12594–12598.
- Gebbia, J. A., J. L. Coleman, and J. L. Benach. 2001. *Borrelia* spirochetes upregulate release and activation of matrix metalloproteinase gelatinase B (MMP-9) and collagenase 1 (MMP-1) in human cells. Infect. Immun. 69:456–462.
- Gilmore, R. D., Jr., M. L. Mbow, and B. Stevenson. 2001. Analysis of *Borrelia burgdorferi* gene expression during life cycle phases of the tick vector *Ixodes scapularis*. Microbes Infect. 3:799–808.
- Hartmann, K., C. Corvey, C. Skerka, M. Kirschfink, M. Karas, V. Brade, J. C. Miller, B. Stevenson, R. Wallich, P. F. Zipfel, and P. Kraiczy. 2006. Functional characterization of BbCRASP-2, a distinct outer membrane protein of *Borrelia burgdorferi* that binds host complement regulators factor H and FHL-1. Mol. Microbiol. 61:1220–1236.
- Hefty, P. S., S. E. Jolliff, M. J. Caimano, S. K. Wikel, and D. R. Akins. 2002. Changes in the temporal and spatial patterns of outer surface lipoprotein expression generate population heterogeneity and antigenic diversity in the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. Infect. Immun. 70:3468–3478.
- Hodjic, E., S. Feng, K. J. Freet, and S. W. Barthold. 2003. *Borrelia burgdorferi* population dynamics and prototype gene expression during infection of

- immunocompetent and immunodeficient mice. *Infect. Immun.* **71**:5042–5055.
25. Hodzic, E., S. Feng, K. J. Freet, D. L. Borjesson, and S. W. Barthold. 2002. *Borrelia burgdorferi* population kinetics and selected gene expression at the host-vector interface. *Infect. Immun.* **70**:3382–3388.
 26. Klempner, M. S., R. Noring, M. P. Epstein, B. McCloud, R. Hu, S. A. Limentani, and R. A. Rogers. 1995. Binding of human plasminogen and urokinase-type plasminogen activator to the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *J. Infect. Dis.* **171**:1258–1265.
 27. Knaust, A., M. V. R. Weber, S. Hammerschmidt, S. Bergmann, M. Frosch, and O. Kurzai. 2007. Cytosolic proteins contribute to surface plasminogen recruitment of *Neisseria meningitidis*. *J. Bacteriol.* **189**:3246–3255.
 28. Kraiczy, P., J. Hellwage, C. Skerka, H. Becker, M. Kirschfink, M. M. Simon, V. Brade, P. F. Zipfel, and R. Wallich. 2004. Complement resistance of *Borrelia burgdorferi* correlates with the expression of BbCRASP-1, a novel linear plasmid-encoded surface protein that interacts with human factor H and FHL-1 and is unrelated to Erp proteins. *J. Biol. Chem.* **279**:2421–2429.
 29. Kraiczy, P., J. Hellwage, C. Skerka, M. Kirschfink, V. Brade, P. F. Zipfel, and R. Wallich. 2003. Immune evasion of *Borrelia burgdorferi*: mapping of a complement inhibitor factor H-binding site of BbCRASP-3, a novel member of the Erp protein family. *Eur. J. Immunol.* **33**:697–707.
 30. Kunert, A., J. Losse, C. Gruszin, M. Huhn, K. Kaendler, S. Mikkat, D. Volke, R. Hoffmann, T. S. Jokiranta, H. Seeberger, U. Moellmann, J. Hellwage, and P. F. Zipfel. 2007. Immune evasion of the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*: elongation factor Tuf is a factor H and plasminogen binding protein. *J. Immunol.* **179**:2979–2988.
 31. Lagal, V., D. Portnoi, G. Faure, D. Postic, and G. Baranton. 2006. *Borrelia burgdorferi* sensu stricto invasiveness is correlated with OspC-plasminogen affinity. *Microbes Infect.* **8**:645–652.
 32. Lahteenmaki, K., S. Edelman, and T. K. Korhonen. 2005. Bacterial metastasis: the host plasminogen system in bacterial invasion. *Trends Microbiol.* **13**:79–85.
 33. Lahteenmaki, K., P. Kuusela, and T. K. Korhonen. 2001. Bacterial plasminogen activators and receptors. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**:531–552.
 34. Liang, F. T., M. B. Jacobs, L. C. Bowers, and M. T. Philipp. 2002. An immune evasion mechanism for spirochetal persistence in Lyme borreliosis. *J. Exp. Med.* **195**:415–422.
 35. Liang, F. T., F. K. Nelson, and E. Fikrig. 2002. Molecular adaptation of *Borrelia burgdorferi* in the murine host. *J. Exp. Med.* **196**:275–280.
 36. Marconi, R. T., S. Y. Sung, C. A. N. Hughes, and J. A. Carlyon. 1996. Molecular and evolutionary analyses of a variable series of genes in *Borrelia burgdorferi* that are related to *ospE* and *ospF*, constitute a gene family, and share a common upstream homology box. *J. Bacteriol.* **178**:5615–5626.
 37. McDowell, J. V., S. Y. Sung, G. Price, and R. T. Marconi. 2001. Demonstration of the genetic stability and temporal expression of select members of the Lyme disease spirochete OspF protein family during infection in mice. *Infect. Immun.* **69**:4831–4838.
 38. Miller, J. C., K. Narayan, B. Stevenson, and A. R. Pachner. 2005. Expression of *Borrelia burgdorferi* *erp* genes during infection of non-human primates. *Microb. Pathog.* **39**:27–33.
 39. Miller, J. C., and B. Stevenson. 2006. *Borrelia burgdorferi* *erp* genes are expressed at different levels within tissues of chronically infected mammalian hosts. *Int. J. Med. Microbiol.* **296**(Suppl. 1):185–194.
 40. Miller, J. C., K. von Lackum, K. Babb, J. D. McAlister, and B. Stevenson. 2003. Temporal analysis of *Borrelia burgdorferi* Erp protein expression throughout the mammal-tick infectious cycle. *Infect. Immun.* **71**:6943–6952.
 41. Miller, J. C., K. von Lackum, M. E. Woodman, and B. Stevenson. 2006. Detection of *Borrelia burgdorferi* gene expression during mammalian infection using transcriptional fusions that produce green fluorescent protein. *Microb. Pathog.* **41**:43–47.
 42. Montgomery, R. R., S. E. Malawista, K. J. M. Feen, and L. K. Bockenstedt. 1996. Direct demonstration of antigenic substitution of *Borrelia burgdorferi* ex vivo: exploration of the paradox of the early immune response to outer surface proteins A and C in Lyme disease. *J. Exp. Med.* **183**:261–269.
 43. Nordstrand, A., A. Shamaei-Tousi, A. Ny, and S. Bergstrom. 2001. Delayed invasion of the kidney and brain by *Borrelia crocidurae* in plasminogen-deficient mice. *Infect. Immun.* **69**:5832–5839.
 44. Pancholi, V., and V. A. Fischetti. 1998. α -Enolase, a novel strong plasminogen binding protein on the surface of pathogenic streptococci. *J. Biol. Chem.* **273**:14503–14515.
 45. Plow, E. F., T. Herren, A. Redlitz, L. A. Miles, and J. L. Hoover-Plow. 1995. The cell biology of the plasminogen system. *FASEB J.* **9**:939–945.
 46. Rooijakkers, S. H., W. J. van Wamel, M. Ruyken, K. P. van Kessel, and J. A. van Strijp. 2005. Anti-opsonic properties of staphylokinase. *Microbes Infect.* **7**:476–484.
 47. Rossmann, E., P. Kraiczy, P. Herzberger, C. Skerka, M. Kirschfink, M. M. Simon, P. F. Zipfel, and R. Wallich. 2007. Dual binding specificity of a *Borrelia hermsii*-associated complement regulator-acquiring surface protein for factor H and plasminogen discloses a putative virulence factor of relapsing fever spirochetes. *J. Immunol.* **178**:7292–7301.
 48. Steere, A. C. 2001. Lyme disease. *N. Engl. J. Med.* **345**:115–125.
 49. Stevenson, B., J. L. Bono, T. G. Schwan, and P. Rosa. 1998. *Borrelia burgdorferi* Erp proteins are immunogenic in mammals infected by tick bite, and their synthesis is inducible in cultured bacteria. *Infect. Immun.* **66**:2648–2654.
 50. Stevenson, B., T. Bykowski, A. E. Cooley, K. Babb, J. C. Miller, M. E. Woodman, K. von Lackum, and S. P. Riley. 2006. The Lyme disease spirochete Erp lipoprotein family: structure, function and regulation of expression, p. 354–372. *In* F. C. Cabello, H. P. Godfrey, and D. Hulinska (ed.), *Molecular biology of spirochetes*. IOS Press, Amsterdam, The Netherlands.
 51. Stevenson, B., H. A. Choy, M. Pinne, M. L. Rotondi, M. C. Miller, E. Demoll, P. Kraiczy, A. E. Cooley, T. P. Creamer, M. A. Suchard, C. A. Brissette, A. Verma, and D. A. Haake. 2007. *Leptospira interrogans* endostatin-like outer membrane proteins bind host fibronectin, laminin and regulators of complement. *PLoS ONE* **2**:e1188.
 52. Stevenson, B., and J. C. Miller. 2003. Intra- and interbacterial genetic exchange of Lyme disease spirochete *erp* genes generates sequence identity amidst diversity. *J. Mol. Evol.* **57**:309–324.
 53. Stevenson, B., K. Tilly, and P. A. Rosa. 1996. A family of genes located on four separate 32-kilobase circular plasmids in *Borrelia burgdorferi* B31. *J. Bacteriol.* **178**:3508–3516.
 54. Stevenson, B., W. R. Zückert, and D. R. Akins. 2001. Repetition, conservation, and variation: the multiple cp32 plasmids of *Borrelia* species, p. 87–100. *In* M. H. Saier and J. Garcia-Lara (ed.), *The spirochetes: molecular and cellular biology*. Horizon Press, Oxford, United Kingdom.
 55. Sun, H. 2006. The interaction between pathogens and the host coagulation system. *Physiology* **21**:281–288.
 56. Tilly, K., J. G. Krum, A. Bestor, M. W. Jewett, D. Grimm, D. Bueschel, R. Byram, D. Dorward, M. J. VanRaden, P. Stewart, and P. Rosa. 2006. *Borrelia burgdorferi* OspC protein required exclusively in a crucial early stage of mammalian infection. *Infect. Immun.* **74**:3554–3564.
 57. Veiga-Malta, I., M. Duarte, M. Dinis, D. Tavares, A. Videira, and P. Ferreira. 2004. Enolase from *Streptococcus sobrinus* is an immunosuppressive protein. *Cell. Microbiol.* **6**:79–88.
 58. Wilske, B., V. Fingerle, and U. Schulte-Spechtel. 2007. Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **49**:13–21.
 59. Zückert, W. R. 2007. Laboratory maintenance of *Borrelia burgdorferi*, p. 12C.1.1–12C.1.10. *In* R. T. Coico, T. F. Kowalik, J. Quarles, B. Stevenson, and R. Taylor (ed.), *Current protocols in microbiology*. J. Wiley and Sons, Hoboken, NJ.

Editor: R. P. Morrison

4.3. Manuskript 3: Plasminogen is a Potent Complement Inhibitor

Plasminogen is a Potent Complement Inhibitor

Diana Barthel¹, Susann Schindler¹, Peter F. Zipfel^{1,2}

¹Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology, Department of Infection Jena, Germany;

²Friedrich Schiller University, 07743 Jena, Germany

Running titel

Corresponding author: Address correspondence to: Prof. Dr. Peter F. Zipfel, Department of Infection Biology, Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology, Hans-Knoell-Institute

Beutenberg Str. 11a, 07745 Jena, Germany, Phone: +49 (0) 36415321300, Email: peter.zipfel@hki-jena.de

Plasminogen is a 92 kDa single-chain glycoprotein that circulates in plasma as a zymogen, and when converted to proteolytically active plasmin dissolves preformed fibrin clots and extracellular matrix components. Here, we characterize the role of plasmin(ogen) in the complement cascade. Plasminogen binds the central complement proteins C3, the C3 cleavage products C3b, C3d and also to C5. Plasminogen binds to C3, C3b, C3d as well as C5 via lysine residues and the interaction is ionic strength dependent. Plasminogen and also Factor H bind C3b, however the two proteins bind to different sites and do not compete for binding. Plasminogen affects complement action in multiple ways. Plasminogen enhanced Factor I mediated C3b degradation in the presence of the cofactor Factor H. Plasminogen when activated to plasmin

inhibited complement as demonstrated by hemolytic assays using either rabbit- or sheep erythrocytes. Similarly plasmin either in fluid phase or attached to surfaces inhibited complement which was activated via the alternative and classical pathway and cleaved C3b to fragments of 68, 40, 30 and 17 kDa. These C3b fragments generated by plasmin differ in size from that generated by the complement protease Factor I, suggesting that plasmin mediated C3b cleavage fragments lack effector function. Plasmin also cleaved C5 to products of 65, 50, 30 and 25 kDa. Thus, due to this regulatory effects plasmin(ogen) links the two central cascade systems complement and coagulation. This regulatory role and complement inhibitory activity by plasmin provides a new explanation why pathogenic microbes utilized plasmin(ogen) for immune evasion and tissue penetration.

INTRODUCTION

Plasminogen is a 92 kDa single-chain human plasma glycoprotein that circulates in plasma as an inactive proenzyme. Plasminogen is composed of a N-terminal preactivation peptide (~8 kDa), five consecutive disulfide-bounded kringle domains (K1 to K5) and a serine protease domain (1,2). Plasminogen, which has a plasma concentration of ~2 μ M is primarily synthesized and secreted by liver cells (3). Plasminogen is converted to the active serine protease plasmin by human activators like urokinase-type (uPA) and tissue-type (tPA) plasminogen activators, and also by bacterial activators, such as staphylokinase (SAK) and streptokinase (4). Plasmin, as the key enzyme of the coagulation system dissolves preformed fibrin clots and regulates fibrinolysis and homeostasis. Furthermore, plasmin also degrades components of the extra cellular matrix (ECM) and the basal membrane, including laminin, fibrin and fibrinogen (5). Plasmin also activates matrix metalloproteases and elastase, which regulate wound healing, tissue remodeling, tumor metastasis and angiogenesis (6).

The coagulation system maintains tissue homeostasis, prevents blood clotting and induces fibrin clots formation upon vessel damage or injury. In addition, the coagulation system as part of the innate immune response aids in host defense against invading microbes and initiates protective inflammatory responses against foreign invaders (7). The coagulation cascade is activated at exposed or damaged surfaces and this activation ultimately leads to platelet aggregation, clot- and thrombus formation. Upon vessel injury, also the coagulation cascade is activated and generates the serine protease thrombin that forms a fibrin clot by converting

fibrinogen to fibrin (8,9). Plasmin has an antagonistic effect and this protease degrades fibrin and dissolves the blood clot (10-13).

As damaged and newly exposed surfaces represent sites for complement activation it is necessary to understand how complement is both activated and regulated at these sites. The complement system represents a central defense system of the human organism which maintains homeostasis. The individual complement components, proteases and inhibitors are activated in cascade-like fashion and the third component C3 is central for this activation (14-16). Complement is activated by three major pathways, the alternative- (AP), the classical- (CP) and the lectin pathway (LP). The AP is spontaneously activated, the CP is initiated by immune complexes and the LP is triggered by specific carbohydrates, such as mannan which is exposed on bacterial surfaces. Each of the three pathways generates a C3 convertase that cleaves the central protein C3 (14,15). This cleavage generates the anaphylactic, as well as antimicrobial peptide C3a and forms C3b, which deposits onto any nearby surfaces and which acts as an opsonin (17). Binding of a second C3b protein to the C3 convertase (C3bBb) generates a C5 convertase, which upon cleavage of C5 generates the anaphylatoxin C5a and C5b (18). The complement system is tightly regulated by soluble and membrane bound proteins. Factor H, FHL-1 and the C4b-binding protein (C4BP) are main soluble complement regulators which act at the level of the C3 convertase (19,20). The AP regulator Factor H serves as a cofactor for the serine protease Factor I that cleaves and inactivates C3b, whereas C4BP, which is also a cofactor for Factor I

binds C4b and inhibits the CP C3 convertase (21,22).

The coagulation- and the complement cascades, of the human organism are tightly connected (23). The cross talk of these two major cascade systems are a focus of ongoing interest and proteases that act in both systems are of special interest. Already 50 years ago Pillemer et al. showed that plasminogen, when activated by the staphylococcal SAK cleaves the complement proteins C1, C2, C3 and C4 and inhibits complement activation (24). In addition, Ward et al. reported in 1967 that plasmin by cleaving C3 and C5 generated biologically active anaphylatoxins (7,25-27). Similarly, plasma treated with the human plasminogen activator uPa generated a protease that interfered with fibrinolysis (28). In addition thrombin, the central coagulation protease cleaves C5 and initiates a fourth complement activation pathway that bypasses C3 (29). So far an activating effect of the two coagulation proteases for complement cascade was proposed, as thrombin and plasmin cleave the central complement proteins C3 and C5 and generate the anaphylatoxins C3a and C5a (27). However, whether the two coagulation proteases allow further processing and even inactivation of the two complement components is unclear.

Both, the coagulation and the complement cascade maintain homeostasis, and components of both cascades recognize and eliminate infectious microbes. However, pathogenic microbes, which survive in an immunocompetent host have found special means to control both host cascades and block the action of effector molecules. Plasminogen as a component of

the coagulation system and similarly Factor H, FHL-1, CFHR1 and C4BP as major soluble regulator of the complement cascade are acquired by a large number of human pathogens like *Haemophilus influenzae* (30,31,Barthel et al., *in press*), *Pseudomonas aeruginosa* (32), *Borrelia burgdorferi* (33-35), *Streptococcus aureus* (36), *Streptococcus pneumoniae* (37), *Staphylococcus* (38), and *Candida albicans* (39,40). For several pathogens, the corresponding microbial binding proteins have been identified. Plasminogen bound to several of these microbial proteins is activated by human, as well as microbial activators to plasmin, which cleaves the natural substrates fibrinogen and C3b (36,41).

As several microbial and fungal complement evasion proteins bind Factor H and also plasminogen (36,41), we hypothesized that plasmin(ogen) has a complement regulatory role. Therefore we analyzed whether plasmin inhibits the complement cascade and whether plasminogen binds to human complement proteins. Here, we characterize plasmin as a complement regulator, modulator and inhibitor. Plasminogen binds several human complement proteins like C3, C3b and C5. When activated plasmin cleaves the central human complement proteins C3b and C5 and generates cleavage fragments that are distinct from that generated by the complement protease Factor I. Plasminogen enhances the cofactor activity of Factor H. Understanding the role of plasmin for complement regulation provides also a basis for novel therapeutics targets for e.g. bacterial infections.

MATERIALS AND METHODS

Proteins and antisera

Human plasminogen, uPa (Haemochrom Diagnostica) as well as the complement proteins C3, C3b, C3c, C3d, C3a, C5 and Factor H (CompTech) were used for binding studies. Plasmin was generated by incubation of plasminogen and uPa for 15 min at 37°C. Proteins were identified with goat antiserum specific for plasminogen (Acris Antibodies), complement proteins of C3, C3d, C5 or Factor H (CompTech), or rabbit antiserum specific for C3a (Comptech). Corresponding horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antiserum were purchased from Dako and the protease inhibitors aprotinin, α_2 -antiplasmin (α_2 -AP) and ϵ -amino caproic acid (ϵ ACA) from Calbiochem and Sigma, respectively. Sheep and rabbit erythrocytes were used from Rockland.

Protein binding assays

For ligand affinity assays, individual complement proteins were separated by SDS-Page and transferred to a membrane (PVDF, Millipore). The membrane was blocked with blocking buffer (1 % BSA, 4 % milk powder in PBS and 0.1 % Tween20) over night at 4°C, following incubation with plasminogen (20 μ g/ml) for 1.5 h at room temperature. After washing three times with PBS-T (PBS + 0.05 % Tween20), bound plasminogen was identified by Western blotting with appropriate antiserum and corresponding HRP-antiserum.

For ELISA, investigated proteins (each at 0.5 μ g in 50 μ l carbonate-bicarbonate buffer, Sigma) were immobilized onto a 96-well-microtiter plate (MaxiSorb, Nunc) over night at 4°C. After washing three times with PBS-T, wells were blocked with Blocking Buffer I (AppliChem) for 2 h at 37°C. The

appropriate ligand (1 μ g in 100 μ l PBS) was added either alone or together with the lysine analogue ϵ ACA or NaCl. After incubation for 1.5 h at room temperature, unbound protein was removed by washing three times with PBS-T, and bound proteins were identified with appropriate antiserum and corresponding HRP-antiserum. After three additional washing steps, orthophenylenediamine (OPD, DakoCytomation) was added, the reaction was stopped by addition of 2 M H_2SO_4 and the absorption was measured at 492 nm in a microtiter plate reader.

For surface plasmon resonance assays a Biacore 3000 instrument was used. Complement proteins C3b or C3d were immobilized via standard amine coupling to the flow cells of a CMD 500m sensor chip as described (42). The surface of the flow cells was activated and the analyte diluted in coupling buffer (10 mM acetate buffer, pH 4.0) was injected until an appropriate level of coupling was reached (~5000 resonance units). Plasminogen in absence or presence of 10 mM ϵ ACA was used as analytes at the indicated concentrations at a flow rate of 20 μ l/min at 25°C in 150 mM PBS.

In addition, the effect of plasminogen on Factor H binding to immobilized C3b was analyzed by ELISA. Factor H (used at 1 μ g/well) and plasminogen were combined at different molar ratios and then the mixtures were added to immobilized C3b (0.5 μ g/well). Following incubation and extensive washing, each serum protein was detected separately with specific antiserum.

Cofactor assay

Cofactor activity of plasminogen was analyzed by measuring of Factor I mediated degradation of C3b by Western blotting. Plasminogen at increasing concentrations (1 to 10 μ g) were added to Factor H (30 ng),

Factor I (30 ng) and C3b (0.3 µg). Reaction mixture were separated by SDS-PAGE, transferred to a membrane and detected using goat C3 antiserum. Intense of degradation products (β chain and α' 43 band) were analyzed by densitometry.

Complement cleavage assay

Cleavage of C3b and C5 was assayed in fluid and solid phase. For fluid phase activity, plasminogen (0.5 µg), uPa (0.25 µg) and C3b or C5 (0.5 µg) were mixed in PBS and the mixture was incubated for 1 h at 37°C. The protein degradation was assayed in the absence or presence of 5 µg/ml aprotinin, 5 µg/ml α_2 -AP or 1 mM ϵ ACA. In control experiments, C3b was incubated with Factor H and Factor I as well as with plasminogen or uPa. Sample were separated by SDS-Page, transferred to a membrane and cleavage products were detected with appropriate antiserum and corresponding HRP-conjugated antiserum.

For solid phase activity, plasminogen (0.5 µg in 50 µl carbonate-bicarbonate buffer) was immobilized onto a microtiter plate over night at 4°C. After washing with PBS-T, blocking buffer (PBS + 0.2 % gelatine) was added and incubated overnight at 4°C. Following washing uPa and C3b (0.5 µg in PBS) were added and the mixture was incubated at 37°C. At the indicated times (0.5, 1, 5 and 24 h) samples were resumed and separated by SDS-Page under reducing conditions, transferred to a membrane and assayed by Western blotting using goat C3 antiserum.

Wieslab- ELISA

To assay the effect of plasmin on each of the three complement pathways a WiELISA (Wieslab) was used according to the instructions of the supply. Plasmin at increasing concentration (0.5-2 µM) was

added to NHS. After incubation for 30 min at 37°C, NHS was added to WiELISA-microtiter plate. MAC (C5b-9) formation was measured with a specific alkaline phosphatase labeled antiserum to a neoantigen expressed during MAC formation.

Hemolysis assay (*alternative pathway activation*)

Plasmin was mixed with NHS (16 %) in AP buffer (20 mM Hepes, 144 mM NaCl, 7 mM MgCl_2 , 10 mM EGTA, pH 7.4). The mixture was incubated at 37°C for 2 h. Washed rabbit erythrocytes ($5 \times 10^6/\text{ml}$) were added and further incubated for 30 min at 37°C. Hemolytic activity was also performed in presence of plasminogen or uPa alone, or the serine protease inhibitor aprotinin. After incubation, each sample was centrifuged at 5000 x rpm for 2 min, the supernatant were added to a microtiter plate and the optical density was measured at 414 nm.

Hemolysis assay (*classical pathway activation*)

Sheep erythrocytes were washed 3 times with ice-cold CP buffer (20 mM Hepes, 144 mM NaCl, 2.5 mM MgCl_2 , 5 mM Ca^{2+} , pH 7.4) and $1 \times 10^9/\text{ml}$ erythrocytes were mixed 1:2 with amboceptor solution (1:3000 in CP buffer, Dade Behring). After incubation for 20 min at 37°C cells were washed again and adjusted to $2 \times 10^8/\text{ml}$. Plasmin was mixed with NHS (0.8 %) in CP buffer and incubated with sheep erythrocytes. Hemolytic activity was also performed in absence of uPa or in presence of α_2 -AP. After incubation of 1 h at 37°C, samples were centrifuged at 2000x rpm for 3 min, the supernatant were added to a microtiter plate and the optical density was measured at 414 nm.

Zymosan assay

Plasmin(ogen) (5 or 10 µg) was mixed with 7.5 % NHS in PBS (supplemented with 10 mM EGTA, 3 mM MgCl₂). For activation, zymosan (1 mg/ml) was added. Assay was prepared in the absence or presence of plasmin(ogen), uPa (0.2 µg), Factor H (5 µg) or zymosan. Samples were incubated for 20 min at 37°C, centrifuged at 13000 x rpm for 2 min and the supernatant was separated by SDS-PAGE under reducing conditions and transferred to a membrane. After blocking with blocking buffer overnight at 4°C, membrane were washed three times with PBS-T. Proteins were identified using rabbit C3a antiserum for 1 h at room temperature. In addition, C3a was quantified by C3a-ELISA-Kit (Quidel) according to the instructions supplied with the kit.

RESULTS

Plasminogen binds to the central complement proteins C3 and C5

Interaction of plasminogen with C3 and C5 was assayed by analyzing binding of the two human complement proteins to immobilized plasminogen. Both C3 and C5 bound to immobilized plasminogen as revealed by ELISA (Fig. 1A). Thus, plasminogen interacts directly with the two central complement proteins C3 and C5 and in this assay, C5 bound to plasminogen with higher intensity (*column 2*).

Plasminogen binds to C3 and C3 activation fragments

Next we assayed binding of plasminogen also to C3 activation and cleavage fragments. Using a reverse setting plasminogen bound to immobilized intact C3, as well as C3b, C3c, C3d, but not to C3a (Fig. 1B). In this assay, plasminogen

bound with highest intensity to C3d (*column 4*).

Similarly binding of C3, C3b or C3d to immobilized plasminogen was assayed. Again, intact C3, C3b and also C3d bound to plasminogen and binding was dose dependent (Fig. 1C). C3d bound plasminogen with highest intensity (▲). Binding was further confirmed by ligand blotting. To this end, C3 and the various C3 fragments were separated by SDS-PAGE, and after transfer to a membrane, plasminogen was added and bound plasminogen was detected. Again, plasminogen bound to C3 (165 kDa), C3b (150 kDa), C3c (110 kDa) and C3d (40 kDa), but not to C3a (11 kDa; Fig. 1D; *lanes 1-3 and 6-7*).

Plasminogen binding to C3b and C3d was confirmed by surface plasmon resonance by assaying binding to immobilized C3b or C3d. Plasminogen used as an analyte had a strong association to both C3b and C3d. At concentrations from 50 to 400 nM binding was dose dependent (Fig. 1E and 1F). The complexes were rather stable, and the dissociation profile was rather slow. In this set up, plasminogen bound to both C3b and C3d with similar intensity.

Plasminogen C3 interaction is mediated by lysine residues and is affected by ionic strength

C3 has about 7 % lysine residues and therefore we hypothesized that the lysine analogue εACA affected the interaction (4). εACA inhibited plasminogen binding to C3, C3b and more efficiently to C3d. The effect was dose dependent. εACA, at a concentration of 1 mM, inhibited plasminogen binding to C3d by 75 %, to C3b by 60 %, and to C3 by 40 % (Fig. 2A). In addition, the effect of ionic strength was

assayed. NaCl influenced plasminogen binding to all three C3 variants to a rather similar extent and again, the effect was dose dependent. NaCl, at the physiological level of 150 mM, decreased plasminogen binding to C3 and the C3 variants by about 40 % and at a concentration at 1 M, NaCl inhibited plasminogen binding to C3 and the C3-variants by 80 % (Fig. 2B).

The inhibitory effect of ϵ ACA on plasminogen C3b or C3d interaction was confirmed by surface plasmon resonance. ϵ ACA inhibited plasminogen binding to the complement proteins C3b or C3d. Again, the effect was dose dependent and ϵ ACA, at a concentration of 1 mM, inhibited plasminogen binding to C3b and to C3d almost completely (Fig. 2C and D). Thus, plasminogen binding to C3 and to the C3b and C3d activation fragments is mediated by lysine residues and is ionic strength dependent.

Plasminogen and Factor H bind C3b at separate sites and do not compete for binding

As both plasminogen and Factor H bind to C3b we asked if the two human plasma proteins bind to identical, overlapping or to distinct sites of the C3b protein and if the two proteins compete for binding. Therefore the effect of plasminogen on Factor H binding to immobilized C3b was analyzed. Plasminogen did not compete Factor H binding to C3b and even at a molar ratio of 1:10 plasminogen did not affect Factor H binding (Fig. 2E). In the presence of Factor H plasminogen bound to C3b and binding was dose dependent. The molar ratio of plasminogen:Factor H in plasma is approximately 1:2.5 and at this concentration both proteins bind to C3b. Thus, plasminogen and Factor H bind

simultaneously to C3b and the two human plasma proteins do not compete for binding.

Plasminogen binds to C5

Plasminogen binds to C5 (Fig. 1A) and this interaction was characterized in more detail. Plasminogen bound to immobilized C5 and similarly C5 bound to immobilized plasminogen (Fig. 3A). Plasminogen binding was dose dependent and even at a concentration of 1.5 μ g, binding was not saturated (Fig. 3B). Thus, plasminogen is both a C5- and C3- binding protein.

Again, the role of lysine residues and ionic strength for the plasminogen-C5 interaction was analyzed. The lysine analogue ϵ ACA inhibited plasminogen binding to C5, and the effect was dose dependent. At 1 mM, ϵ ACA inhibited binding to C5 by 50 % (Fig. 3C). Similarly, NaCl affected plasminogen binding. NaCl, at the physiological level of 150 mM, reduced C5 binding by 50 % and at 600 mM, NaCl inhibited binding by 70 % (Fig. 3C). Thus, plasminogen binds to C5, and binding is mediated by lysine residues and the interaction is ionic strength dependent.

Plasminogen enhances cofactor activity of Factor H

As both plasminogen and Factor H bind to C3b simultaneously, we asked whether plasminogen influences cofactor activity of Factor H for Factor I mediated C3b degradation. Plasminogen, Factor H and Factor I were added to C3b. After incubation the reaction mixture was separated by SDS-Page, transferred to membrane, and cleavage products were identified by Western blotting. Intact C3b was detected as α' - and β -chain (Fig. 4A, lane 1). Factor I in the presence of the cofactor Factor H cleaved C3b as demonstrated by appearance of the α' 68, α' 43 and α' 41

bands (*lane 2*). In the presence of the zymogen plasminogen, C3b cleavage was enhanced as revealed by higher intensity of the α' -chain cleavage fragments of 43 and 41 kDa (*lanes 3-5*). The intensity of the α' 43 increased by 17 % as revealed by densitometry (based on the ratio of β 75/ α' 43, Fig. 4B). Thus, as a zymogen plasminogen enhances Factor I mediated cleavage of C3b and thereby enhances complement control.

Plasmin cleaves the C3b protein

As plasminogen binds C3b and enhances Factor H mediated cofactor activity, we asked whether plasminogen, when converted to plasmin cleaves C3b. First, C3b cleavage by plasmin was assayed in fluid phase. Plasminogen was converted by uPa to the active protease plasmin and then C3b was added. After incubation the reaction mixture was separated by SDS-PAGE, transferred to a membrane and C3b cleavage products were identified by Western blotting. Intact C3b was identified by the α' and β chain (Fig. 5A, *lane 1*). Plasmin cleaved C3b, and cleavage fragments were identified as α' 68, α' 40, α' 30 and α' 17 bands (*lane 2*). Except for the α' 68 fragment, the fragments generated by plasmin were distinct from that generated by the complement protease Factor I in the presence of Factor H (*lane 6*). The 68 kDa fragments generated by both protease have comparable mobilities, thus suggesting that plasmin and also Factor I cleave the α' -chain at the same site. However, the additional three fragments of α' 40, α' 30 and α' 17 are only generated by plasmin and are unique in size. Thus, plasmin cleaves C3b, and generates unique C3b fragments.

ϵ ACA affected plasminogen binding to C3b, we therefore asked whether ϵ ACA influences the cleavage by plasmin. ϵ ACA,

used at 1 mM inhibited plasmin mediated C3b cleavage weakly (Fig. 5A, *lane 3*). In contrast the serine protease inhibitor aprotinin and the specific plasmin inhibitor α_2 -AP inhibited C3b degradation by plasmin almost completely (*lanes 4 and 5*).

As plasminogen binds to ECM, to exposed subendothelial matrices and is acquired by pathogenic microbes, we next asked whether also surface bound plasminogen, when activated to plasmin inactivates C3b. Plasminogen was immobilized, then uPa and C3b were added, plasmin was generated and proteolytical cleavage of C3b was assayed. Immobilized plasminogen, when converted to plasmin cleaved C3b, cleavage was time dependent and the same cleavage fragments were generated (Fig. 5B, *lanes 2-5*). As single protein plasminogen did not cleave C3b, however uPa generated an additional 55 kDa band (*lanes 6 and 7*). Thus, both surface bound plasmin and also plasmin in solution cleaved C3b and generated the same fragments.

Plasmin cleaves the C5 protein

In addition, the effect of plasmin for C5 cleavage was assayed. In fluid phase plasminogen activated by uPa cleaved C5 and four major cleavage fragments appeared as bands of 65, 50, 30 and 25 kDa (Fig. 6A, *lane 2*). ϵ ACA and aprotinin reduced the plasmin mediated cleavage by around 50 %, and the specific plasmin inhibitor α_2 -AP almost completely blocked C5 cleavage (*lanes 3-5*).

As complement regulation on surfaces is central for tissue homeostasis, we next assayed whether also surface bound plasminogen cleaved C5. Surface attached plasmin cleaved C5 in a time dependent manner and after 30 min bands of 65 kDa and 45 kDa, likely representing intermediate

products appeared. Over time both the pattern of bands and also the intensity of individual cleavage products increased. After 5 and 24 h two additional bands of 50 and 25 kDa were detectable (Fig. 6B, *lanes 2-5*). After 24 h four major degradation fragments of 65, 50, 30 and 25 kDa were detected (*lane 5*). Plasminogen alone did not, and uPa alone had minor effect on C5 cleavage (*lanes 6 and 7*). Thus, surface bound plasmin also cleaves the complement protein C5.

Plasmin inhibits complement activation

To confirm that plasminogen activated to plasmin influences complement activation, we first assayed whether plasmin inhibits complement action in general. Active plasmin, used at increasing concentrations was added to NHS where each complement pathway was activated specifically. Complement activation was recorded by assaying TCC formation. Plasmin at physiological level (2 μ M, \downarrow), inhibited AP and CP activation by 40 % (Fig. 7A and 7B) and inhibited LP activation by 60 % (Fig. 7C). This activity was specific for plasmin, as plasminogen used alone inhibited AP- and CP-activation to a low extent, i.e. by 17 and 32 %, and inhibited LP-activation by 45 %. Similarly, when added separately to NHS, plasminogen or uPA inhibited AP-, CP- and LP activation by 30 %. This effect by the single proteins is explained that these individual proteins when added to NHS disturb the endogenous plasminogen activator and inhibitor balance.

The complement inhibitory effect of plasmin on AP and CP was confirmed in hemolytic assays. First, the effect of plasmin on NHS mediated lysis of rabbit erythrocytes was assayed. Plasminogen and uPa were added to NHS and then rabbit erythrocytes were included. Activated plasmin inhibited lysis of erythrocytes and effect was dose

dependent. Plasmin(ogen), used at a physiological level (i.e. 2 μ M) inhibited erythrocyte lysis by 30 % and at a concentration of 4 μ M plasmin(ogen) inhibited erythrocyte lyses by 80 % (Fig. 8A, \blacklozenge). In the presence of the serine inhibitor aprotinin, which inhibited plasmin activity, erythrocytes remained intact and were not lysed. This effect was dose dependent (Fig. 8A, \bullet). In this assay, neither plasminogen alone, nor uPa affected erythrocyte lysis.

The inhibitory effect of activated plasmin was also assayed for CP. The CP was activated by antiserum specific for sheep erythrocytes, and again complement activation was revealed by erythrocyte lysis. When uPa treated plasminogen was added to NHS together with sheep erythrocytes, plasmin was generated which inhibited erythrocytes lysis. The inhibitory effect was dose dependent and plasmin used at physiological concentration at 2 μ M (\downarrow) inhibited erythrocyte lyses by about 40 % (Fig. 8B). The specific plasmin inhibitor α_2 -AP blocked plasmin mediated lyses in a dose dependent manner (Fig. 8C). Thus, plasmin inhibits complement, which is activated either by the AP or the CP.

As plasmin(ogen) binds to C3b and inhibits complement activation, we next asked if plasmin directly blocks C3 convertase activity. Therefore, the inhibitory effect of plasmin on C3 generation was characterized using zymosan, which activates complement in NHS. Following incubation the reaction mixtures were separated by SDS-Page, transferred to a membrane and C3a generation was followed by Western blotting. Addition of zymosan to NHS activated complement as revealed by the generation of C3a (Fig. 9A, *lane 2*). Plasmin inhibited this C3a generation in a dose dependent manner (*lanes 3 and 4*). When added alone,

plasminogen did not inhibited C3a generation. In contrast, uPa inhibited C3a generation but to a lower extend as compared to plasmin (*lanes 5 and 6*). Factor H, as an inhibitor of the C3 convertase blocked C3a generation completely (*lane 7*).

The effect of plasmin on C3a generation was also quantitated by ELISA. C3a generated by zymosan activated NHS was set 100 % (Fig. 9B, *column 2*). Plasmin(ogen) together with uPa decreased C3a levels by 40 % (*column 3*). Factor H as the C3 convertase inhibitor blocked complement activation by 75 % (*column 4*). Thus, plasmin inhibits the C3 convertase of the AP and consequently inhibits complement cascade progression.

Here, we identify human plasminogen as a C3 and C5 binding protein and demonstrate that upon conversion active plasmin degrades two major complement components, i.e. the activation fragment C3b and C5.

DISCUSSION

Here, we identify human plasminogen as a C3 and C5 binding protein and demonstrate that active plasmin degrades and inactivates the two major complement proteins C3b and C5 and thereby blocks complement effector function. Plasmin cleaves C3b at multiple sites. The first cleavage site is shared by plasmin and the complement protease Factor I. However, the next two cleavage reactions occur at specific sites in the C3b protein generating fragments of unique size. Thus, plasmin by cleaving C3b and C5 inhibits complement activation, blocks formation of C3 effector fragments and consequently inhibits cascade progression. Active plasmin blocks complement activation in fluid phase and also on surfaces. Thereby plasmin can protect the

surface of a damaged self cells or of the exposed subendothelial matrix. In addition the powerful inhibitory effect provides new explanation why many pathogenic microbes attach human plasminogen to their surface and use surface bound plasmin(ogen) for immune evasion.

Plasmin(ogen) which cleaves the complement proteins C3b and C5, and also dissolves fibrin clots links the two important human effector cascades. A regulatory role of plasmin(ogen) for the complement and for the coagulation cascade was already proposed in 1950 by Pillemer (7,24,28) and recently an activating role for plasmin, i.e. generation of chemotactic C3a and C5a activation fragments was reported (27). Here we demonstrate for plasmin an additional inhibitory effect in the complement cascade and show that already the zymogen plasminogen enhances cofactor mediated inactivation of C3b by the complement protease Factor I. In addition, plasmin blocks the C3 and the C5 convertases, favors C3b inactivation, inactivates complement effector components and blocks effector functions.

Plasmin(ogen) blocks all three complement pathways, however to a different extend. Used at physiological levels, plasmin(ogen) blocked AP and CP by about 40 % and inhibited LP activation by 60 %. Similarly in hemolytic assays with either rabbit or sheep erythrocytes, uPa treated plasminogen blocked AP by about 30 % and CP by about 40 %. Thus, demonstrating that even in human serum in the presence of inhibitory proteins, plasmin inhibits complement. Plasmin degrades C3b and thereby blocks C3b effector functions, i.e. cascade progression, formation of the C3 amplification loop and TCC assembly. In addition plasmin(ogen) binds to the

activation fragments C3b, C3c and C3d, but not to the anaphylatoxin C3a.

Plasminogen both in fluid phase and on surfaces is accessible for uPA and is converted to the active protease plasmin, which cleaves and inactivates C3b. Unique cleavage fragments are generated which most likely lack effector function. Thus explaining the complement inhibitory effect revealed in the hemolytic assays.

A large number of pathogenic microbes bind plasminogen to their surface and many microbial plasminogen binding proteins have been identified. Plasminogen binding to the two human complement proteins C3 and C5 is mediated by lysine residues and is ionic strength dependent. Interestingly, this type of interaction is mimicked by pathogen encoded plasmin(ogen) binding proteins, such as PE from *H. influenzae*, Tuf from *P. aeruginosa*, PspC from *S. pneumoniae*, CRASP1 from *B. burgdorferi* or Pra1 and Gmp1 from *C. albicans* (32,37,40,46, Barthel et al., *Jl in press*).

The majority of microbial plasminogen binding proteins bind additional human plasma proteins and complement regulators, including Factor H, FHL-1, CFHR-1 and C4BP (32,39,40,46-48). Plasminogen bound host proteins are either functionally active or in the case of plasminogen are accessible for activators. As the attached human regulators control complement activation, degrade complement activation fragments, enhance cofactor assisted C3 inactivation or degrade ECM proteins these multiple function bacterial surface proteins assist in bacterial survival and contribute to virulence by controlling and by blocking host immune reactions. Surface attached and activated plasmin allows the pathogen to control host complement attack, to cross host immune barriers and to invade human tissue. Thus acquisition of multiple host derived

complement inhibitors by one single pathogen encoded protein is an efficient defense strategy and is used by many pathogenic microbes. The powerful inhibitory effect of acquired plasminogen for immune and complement defense cascade apparently explains why so many pathogenic microbes attach human plasminogen to their surface and how they exploit surface bound plasmin(ogen) for immune evasion.

Plasminogen binds to C3b, the central complement activation fragment which also binds the complement regulator Factor H. The two human regulators bind simultaneously to C3b, they bind to independent sites and they do not compete for binding. Factor H acts as a regulator of the C3 convertase and as a cofactor for the serine protease Factor I, which cleaves and inactivates C3b. Interestingly, plasminogen in the proteolytically inactive form enhanced cofactor assisted inactivation of C3b by Factor I. Thus, even plasminogen prior to conversion and activation contributes to C3b inactivation.

Plasminogen also binds to C5 and plasmin cleaves the α -chain of the C5 protein in a time dependent manner and ultimately four fragments are generated. The first plasmin-mediated cleavage of C5 generates an intermediate fragment of 45 kDa band and C5a (27), and then four fragments of 65, 50, 30 and 25 kDa.

Thus, plasmin(ogen) regulates complement and blocks complement activation on multiple levels: (i) plasminogen the proteolytically inactive zymogen enhances C3b processing by the complement protease Factor I in the presence of the cofactor Factor H; (ii) plasminogen binds to the central complement components C3, to C3 activation fragments C3b, C3c, C3d and to

C5 and when activated to plasmin cleaves and degrades C3b and C5; and (iii) plasminogen, when activated to plasmin blocks all three major complement pathways.

This study shows that plasmin(ogen) is a multifunctional protein and acts on the multiple levels. Plasmin regulates fibrin clot formation and degrades ECM proteins that mediate tissue invasion. However, plasmin has also newly functions in immune evasion

by cleaving complement proteins like C3b and C5.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft. We thank Steffi Hälbig for surface plasmon resonance analysis.

REFERENCES

1. Sottrup-Jensen, L., Zajdel, M., Claeys, H., Petersen, T. E., and Magnusson, S. (1975) *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 2577-2581
2. Castellino, F. J., and McCance, S. G. (1997) *Ciba Found Symp* **212**, 46-60; discussion 60-45
3. Miyashita, C., Wenzel, E., and Heiden, M. (1988) *Haemostasis* **18 Suppl 1**, 7-13
4. Lahteenmaki, K., Edelman, S., and Korhonen, T. K. (2005) *Trends in microbiology* **13**, 79-85
5. Lahteenmaki, K., Kuusela, P., and Korhonen, T. K. (2000) *Methods (San Diego, Calif)* **21**, 125-132
6. Myohanen, H., and Vaheri, A. (2004) *Cell Mol Life Sci* **61**, 2840-2858
7. Amara, U., Rittirsch, D., Flierl, M., Bruckner, U., Klos, A., Gebhard, F., Lambris, J. D., and Huber-Lang, M. (2008) *Adv Exp Med Biol* **632**, 71-79
8. Wolberg, A. S., and Campbell, R. A. (2008) *Transfus Apher Sci* **38**, 15-23
9. Wolberg, A. S. (2007) *Blood Rev* **21**, 131-142
10. Cesarman-Maus, G., and Hajjar, K. A. (2005) *British journal of haematology* **129**, 307-321

11. Degen, J. L., Bugge, T. H., and Goguen, J. D. (2007) *J Thromb Haemost* **5 Suppl 1**, 24-31
12. Moroz, L. A., and Gilmore, N. J. (1976) *Blood* **48**, 531-545
13. Petersen, T. E., Martzen, M. R., Ichinose, A., and Davie, E. W. (1990) *The Journal of biological chemistry* **265**, 6104-6111
14. Walport, M. J. (2001) *N Engl J Med* **344**, 1058-1066
15. Walport, M. J. (2001) *N Engl J Med* **344**, 1140-1144
16. Zipfel, P. F., Mihlan, M., and Skerka, C. (2007) *Adv Exp Med Biol* **598**, 80-92
17. Thurman, J. M., and Holers, V. M. (2006) *J Immunol* **176**, 1305-1310
18. Heinen, S., Hartmann, A., Lauer, N., Wiehl, U., Dahse, H. M., Schirmer, S., Gropp, K., Enghardt, T., Wallich, R., Halbich, S., Mihlan, M., Schlotzer-Schrehardt, U., Zipfel, P. F., and Skerka, C. (2009) *Blood*
19. Zipfel, P. F., Skerka, C., Hellwage, J., Jokiranta, S. T., Meri, S., Brade, V., Kraiczy, P., Noris, M., and Remuzzi, G. (2002) *Biochem Soc Trans* **30**, 971-978
20. Jozsi, M., and Zipfel, P. F. (2008) *Trends Immunol* **29**, 380-387
21. Gigli, I., Fujita, T., and Nussenzweig, V. (1979) *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 6596-6600
22. Zipfel, P. F. (2001) *Semin Thromb Hemost* **27**, 191-199
23. Peerschke, E. I., Yin, W., and Ghebrehiwet, B. (2008) *Adv Exp Med Biol* **632**, 81-91
24. Pillemer, L., Ratnoff, O. D., Blum, L., and Lepow, I. H. (1953) *J Exp Med* **97**, 573-589
25. Taylor, F. B., Jr., and Ward, P. A. (1967) *J Exp Med* **126**, 149-158
26. Ward, P. A. (1967) *J Exp Med* **126**, 189-206
27. Amara, U., Flierl, M. A., Rittirsch, D., Klos, A., Chen, H., Acker, B., Bruckner, U. B., Nilsson, B., Gebhard, F., Lambris, J. D., and Huber-Lang, M. (2010) *J Immunol* **185**, 5628-5636

28. Seya, T., Nagasawa, S., Matsukura, M., Hasegawa, H., and Atkinson, J. P. (1985) *Complement (Basel, Switzerland)* **2**, 165-174
29. Polley, M. J., and Nachman, R. (1978) *J Exp Med* **147**, 1713-1726
30. Hallstrom, T., Jarva, H., Riesbeck, K., and Blom, A. M. (2007) *J Immunol* **178**, 6359-6366
31. Hallstrom, T., Zipfel, P. F., Blom, A. M., Lauer, N., Forsgren, A., and Riesbeck, K. (2008) *J Immunol* **181**, 537-545
32. Kunert, A., Losse, J., Gruszin, C., Huhn, M., Kaendler, K., Mikkat, S., Volke, D., Hoffmann, R., Jokiranta, T. S., Seeberger, H., Moellmann, U., Hellwage, J., and Zipfel, P. F. (2007) *J Immunol* **179**, 2979-2988
33. Kraiczy, P., Skerka, C., Kirschfink, M., Brade, V., and Zipfel, P. F. (2001) *Eur J Immunol* **31**, 1674-1684
34. Kraiczy, P., Skerka, C., Kirschfink, M., Zipfel, P. F., and Brade, V. (2001) *Int Immunopharmacol* **1**, 393-401
35. Seling, A., Siegel, C., Fingerle, V., Jutras, B. L., Brissette, C. A., Skerka, C., Wallich, R., Zipfel, P. F., Stevenson, B., and Kraiczy, P. *Infection and immunity* **78**, 39-48
36. Zipfel, P. F., Hallstrom, T., Hammerschmidt, S., and Skerka, C. (2008) *Vaccine* **26 Suppl 8**, I67-74
37. Agarwal, V., Asmat, T. M., Luo, S., Jensch, I., Zipfel, P. F., and Hammerschmidt, S. (2010) *The Journal of biological chemistry* **285**, 23486-23495
38. Haupt, K., Reuter, M., van den Elsen, J., Burman, J., Halbich, S., Richter, J., Skerka, C., and Zipfel, P. F. (2008) *PLoS Pathog* **4**, e1000250
39. Poltermann, S., Kunert, A., von der Heide, M., Eck, R., Hartmann, A., and Zipfel, P. F. (2007) *The Journal of biological chemistry* **282**, 37537-37544
40. Luo, S., Poltermann, S., Kunert, A., Rupp, S., and Zipfel, P. F. (2009) *Mol Immunol* **47**, 541-550
41. Sun, H. (2006) *Physiology (Bethesda)* **21**, 281-288

42. Weber, S., Lottspeich, F., and Kohl, J. (1995) *Journal of bacteriology* **177**, 11-19
43. Bergmann, S., Rohde, M., Chhatwal, G. S., and Hammerschmidt, S. (2004) *The Indian journal of medical research* **119 Suppl**, 29-32
44. Clinton, S. R., Bina, J. E., Hatch, T. P., Whitt, M. A., and Miller, M. A. *BMC microbiology* **10**, 76
45. Seling, A., Siegel, C., Fingerle, V., Jutras, B. L., Brissette, C. A., Skerka, C., Wallich, R., Zipfel, P. F., Stevenson, B., and Kraiczy, P. (2010) *Infection and immunity* **78**, 39-48
46. Hallstrom, T., Haupt, K., Kraiczy, P., Hortschansky, P., Wallich, R., Skerka, C., and Zipfel, P. F. (2010) *J Infect Dis* **202**, 490-498
47. Berge, A., and Sjobring, U. (1993) *The Journal of biological chemistry* **268**, 25417-25424
48. Kraiczy, P., Rossmann, E., Brade, V., Simon, M. M., Skerka, C., Zipfel, P. F., and Wallich, R. (2006) *Wien Klin Wochenschr* **118**, 669-676

FIGURE LEGEND

FIGURE 1: Plasminogen binds to the central human complement proteins C3 and C5. (A) Plasminogen binding to complement proteins C3 and C5 was analyzed by ELISA. First, binding of C3 or C5 to immobilized plasminogen was assayed. After extensive washing bound proteins were visualized using goat C3- or C5 antiserum and HRP-goat antiserum. **(B)** Similarly binding of plasminogen to immobilized C3 and to the C3 activation fragments C3b, C3c, C3d and C3a was analyzed. Plasminogen bound to immobilized C3, C3b, C3c and C3d, but not to C3a. Plasminogen bound strongest to C3d. **(C)** Plasminogen bound dose dependently to immobilized C3, C3b and C3d. Plasminogen, used at concentrations ranging from 0.25 to 1.0 μg was bound to immobilized C3, C3b and C3d (0.5 $\mu\text{g}/\text{well}$) and after extensive washing bound plasminogen was visualized with goat plasminogen antiserum and HRP-goat antiserum. The bars represent the means of three independent experiments \pm S.D. **(D)** Plasminogen binding to C3 and C3 fragments was also analyzed by Western blotting. Purified C3, and the C3 fragments C3b and C3c were separated by SDS-PAGE, transferred to a membrane and the membrane was incubated with plasminogen. After washing bound plasminogen was detected with plasminogen antiserum. Plasminogen bound to C3 (160 kDa, *lane 1*), C3b (150 kDa, *lane 2*), C3c (130 kDa, *lane 3*), and C3d (40 kDa, *lane 6*). Plasminogen did not bind to C3a (11 kDa, *lane 7*). Gelatine was used as a negative control (*lane 4*) and plasminogen was used as antibody control (*lane 5*). Plasminogen binding to C3b **(E)** and to C3d **(F)** was analyzed by surface plasmon resonance. Each complement protein, i.e. C3b or C3d was immobilized on the chip surface and plasminogen was used as analyte at concentrations ranging from 50 to 400 nM in the fluid phase. Plasminogen bound to both, C3b and C3d as revealed by the increase in resonance units (RU) and binding was dose dependent. The results show a representative result of three independent experiments.

FIGURE 2: Plasminogen C3 interaction is mediated by lysine residues and is affected by ionic strength. (A) The effect of the lysine analogue ϵACA on plasminogen binding to C3, C3b or C3d was analyzed by ELISA. Plasminogen bound to C3, C3b and C3d in the absence of ϵACA was set 100 %. ϵACA used at concentrations ranging from 0.01 to 10 mM inhibited plasminogen binding to immobilized C3, C3b or C3d in a dose dependent manner. At 1.0 mM, ϵACA inhibited plasminogen binding to C3 by 40 %, to C3b by 60 % and C3d by 75 %. **(B)** The interaction of plasminogen to immobilized C3, C3b or C3d is ionic strength dependent and affected by NaCl. The effect of NaCl, used at concentrations from 0.25 to 1.0 M for plasminogen binding to immobilized C3, C3b or C3d was assayed. Again, binding of plasminogen to C3, C3b or C3d was set 100 %. NaCl inhibited plasminogen binding to C3, C3b or C3d, the effect was dose dependent and at physiological level (150 mM), NaCl reduced binding by 40 % (\downarrow). At a concentration of 1 M, NaCl inhibited binding by 80 %. Data show mean values of three experiments and the SD is indicated by error bars. The effect of ϵACA on plasminogen binding to immobilized C3b **(C)** or C3d **(D)** was analyzed by surface plasmon resonance. C3b or C3d were immobilized on the chip surface and plasminogen together with ϵACA were applied in the fluid phase. ϵACA , used at concentrations ranging from 0.5 to 1.0 M inhibited plasminogen binding to both C3b and to C3d as revealed by the reduction in resonance units (RU). The effect was dose dependent. Results of a representative experiment out of three independent

experiments are shown in panels (C) and (D). **(E):** Plasminogen and Factor H bind to independent sites in the C3b protein. Plasminogen did not influence Factor H binding to immobilized C3b. Factor H used a constant levels was bound to immobilized C3b. Plasminogen, added at the indicated molar ratios did not affect Factor H binding and bound dose dependently to C3b. At physiological ratio of 1:2.5 (↓), both plasminogen and Factor H bound to human C3b. Data show mean values of four independent experiments, and the SD is indicated by error bars.

FIGURE 3: Plasminogen binds to the complement protein C5. (A) Plasminogen binding to C5 was assayed by ELISA. Plasminogen bound to immobilized C5 (*black column 1*) and C5 bound to immobilized plasminogen (*black column 2*). Following binding and after extensive washing bound proteins were detected with specific antiserum and HRP-goat antiserum by measuring the absorbance at 492 nm. **(B)** Plasminogen binds dose dependently to immobilized C5. C5 was immobilized and plasminogen was added at the indicated concentrations (0.25-1.5 µg). After extensive washing bound plasminogen was detected. **(C)** εACA (■) and NaCl (♦) influenced plasminogen binding to C5. εACA, used at 0.01 to 10 mM affected plasminogen binding to immobilized C5. εACA inhibited plasminogen binding to C5 dose dependently and at 1 mM, εACA inhibited interaction by 50 %. Similarly, NaCl used at indicated concentrations (50-600 mM) inhibited the plasminogen C5 interaction. Plasminogen bound to C5 in the absence of either εACA or NaCl was set 100 %. Also NaCl affected plasminogen binding to C5 and at the physiological level of 150 mM (↓), NaCl reduced plasminogen binding by 40 %. The bars represent the means of three independent experiments and the S.D. is indicated.

FIGURE 4: Plasminogen enhances cofactor assisted cleavage of C3b by Factor I. (A) Plasminogen enhances cofactor assisted cleavage of C3b for Factor I. Plasminogen, used at 1, 5 or 10 µg was added to Factor H, Factor I and C3b. After incubation the reaction mixture was separated by SDS-PAGE, transferred to a membrane and C3b and C3b degradation fragments were visualized by Western blotting using goat C3 antiserum and HRP-goat antiserum. Intact C3b was detected by α'- and β-chain (*lane 1*). Cleavage of C3 was recorded by the reduced intensity of the 110 kDa α'-band and by the appearance of cleavage products of α'-68, α'-43 and α'-46 bands (*lane 2*). In this set up a relatively low concentration of protease and cofactor was used in order to visualize the increase in intensity of the C3 cleavage products. Plasminogen enhanced the C3b cleavage by Factor I and Factor H dose dependently (*lanes 3-5*). **(B)** Densitometric analyses revealed that in the presence of 10 µg plasminogen the intensity of the α'-43 band was increased by 17 %. A representative experiment out of three is shown.

FIGURE 5: Fluid phase and surface bound plasmin cleaves the C3b. (A) In a fluid phase assay plasminogen was activated by uPa and the C3b was added. After incubation of 1 h, the reaction mixture was separated by SDS-PAGE, transferred to a membrane and degradation of C3b was analyzed by Western blotting using goat C3 antiserum and HRP-goat antiserum. C3b degradation by plasmin was visualized by the appearance of the α'68, α'40, α'30, and α'17 bands (*lane 2*). The mobilities of the α'- and β-chains of the intact C3b protein are shown in *lane 1*. In the presence of the lysine analog εACA, which reduced plasminogen C3b interaction, C3b cleavage was reduced (*lane 3*). Similarly, the serine protease inhibitors aprotinin and also the specific plasmin inhibitor α₂-AP blocked plasmin mediated C3 cleavage (*lanes 4 and 5*).

Cleavage products generated by the complement serine protease Factor I in the presence of a cofactor (Factor H) were α' 68, α' 43, and α' 41 bands and showed different mobilities (*lane 6*). **(B)** Surface bound plasmin degrades C3b. Plasminogen was immobilized onto the surface of a microtiter plate, uPa and C3b were added. After incubation for the indicated time, the supernatant was separated by SDS-PAGE, transferred to a membrane and degradation of C3b was analyzed by Western blotting. Intact C3b was separated in *lane 1*. Surface bound and activated plasmin cleaved C3b. Again the plasmin mediated cleavage products of α' 68, α' 40, α' 30, and α' 17 were detected (*lanes 2-5*). Cleavage was time dependent. Neither plasminogen or uPa alone degraded C3b significantly (*lanes 6 and 7*). A representative experiment out of three is shown.

FIGURE 6: Fluid phase and surface bound plasmin cleaves C5. **(A)** In a fluid phase assay plasminogen was activated by uPa and C5 was added. After incubation of 1 h, the reaction mixture was separated by SDS-PAGE, transferred to a membrane and degradation of C5 was analyzed by Western blotting using goat C5 antiserum and HRP-goat antiserum. C5 degradation by plasmin was visualized by the appearance of the α' 50, α' 45, α' 30, and α' 25 bands (*lane 2*). The mobilities of the α - and β -chains of the intact C5 protein are visualized in *lane 1*. In the presence of the lysine analog ϵ ACA, which reduced plasminogen C5 interaction, C5 cleavage was reduced (*lane 3*). Similarly, the serine protease inhibitor aprotinin also reduced C5 cleavage and the specific plasmin inhibitor α_2 -AP blocked plasmin mediated C5 cleavage to a large extent (*lanes 4 and 5*). **(B)** Surface bound plasmin degrades C5. Plasminogen was immobilized onto the surface of a microtiter plate, then uPa and C5 were added. After incubation for the indicated time, the supernatant was separated by SDS-PAGE, transferred to a membrane and degradation of C5 was analyzed by Western blotting. The mobility of the α - and β -chains of intact C5 was visualized in *lane 1*. Surface bound and activated plasmin cleaved C5. Again, the plasmin mediated cleavage products of α' 65, α' 50, α' 45, α' 30 and α' 25 were detected (*lanes 2-5*). Cleavage was time dependent. Neither plasminogen or uPa alone significantly degraded C5 (*lanes 6 and 7*). A representative experiment out of three is shown.

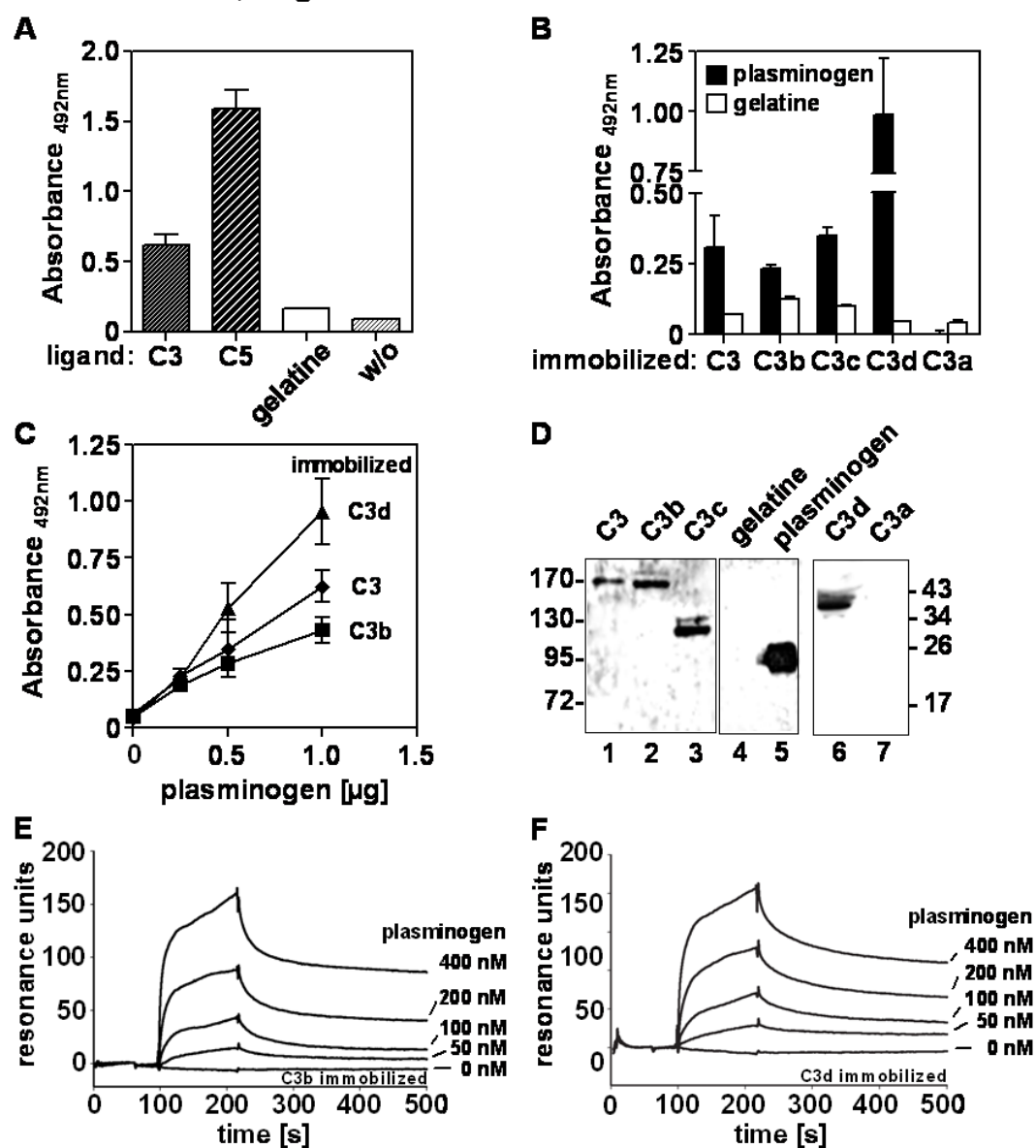
FIGURE 7: Plasmin inhibited complement activation. Plasminogen activated by uPa was added to NHS and the various complement pathway were activated by LPS, IgG or mannan which were all coated onto microtiter plate. Following incubation TCC formation was measured by ELISA using a specific neo TCC antiserum. Plasmin inhibited the AP- **(A)** and CP activation **(B)** in a dose dependent manner. When added at a physiological level of 2 μ M to NHS plasmin inhibited both pathways by about 40 % (\downarrow). Used alone either plasminogen and also uPa showed less effects. **(C)** Plasmin also inhibited LP activation and again the effect was dose dependent. Upon addition of 2 μ M (\downarrow) plasmin to NHS complement activation was inhibited by 60 %. NHS was used as positive control for activation according to Wileisa-Kit. Buffer was used as negative control. A representative experiment out of three is shown.

FIGURE 8: Plasmin inhibits complement mediated hemolysis. **(A)** The effect of plasmin on complement activation was analyzed using a hemolytic assay. Plasminogen was activated by uPa, added to NHS and rabbit erythrocytes. Following incubation of 1 h erythrocyte lyses was evaluated by recorded the release of hemoglobin at 414 nm. Total lysis of erythrocytes was

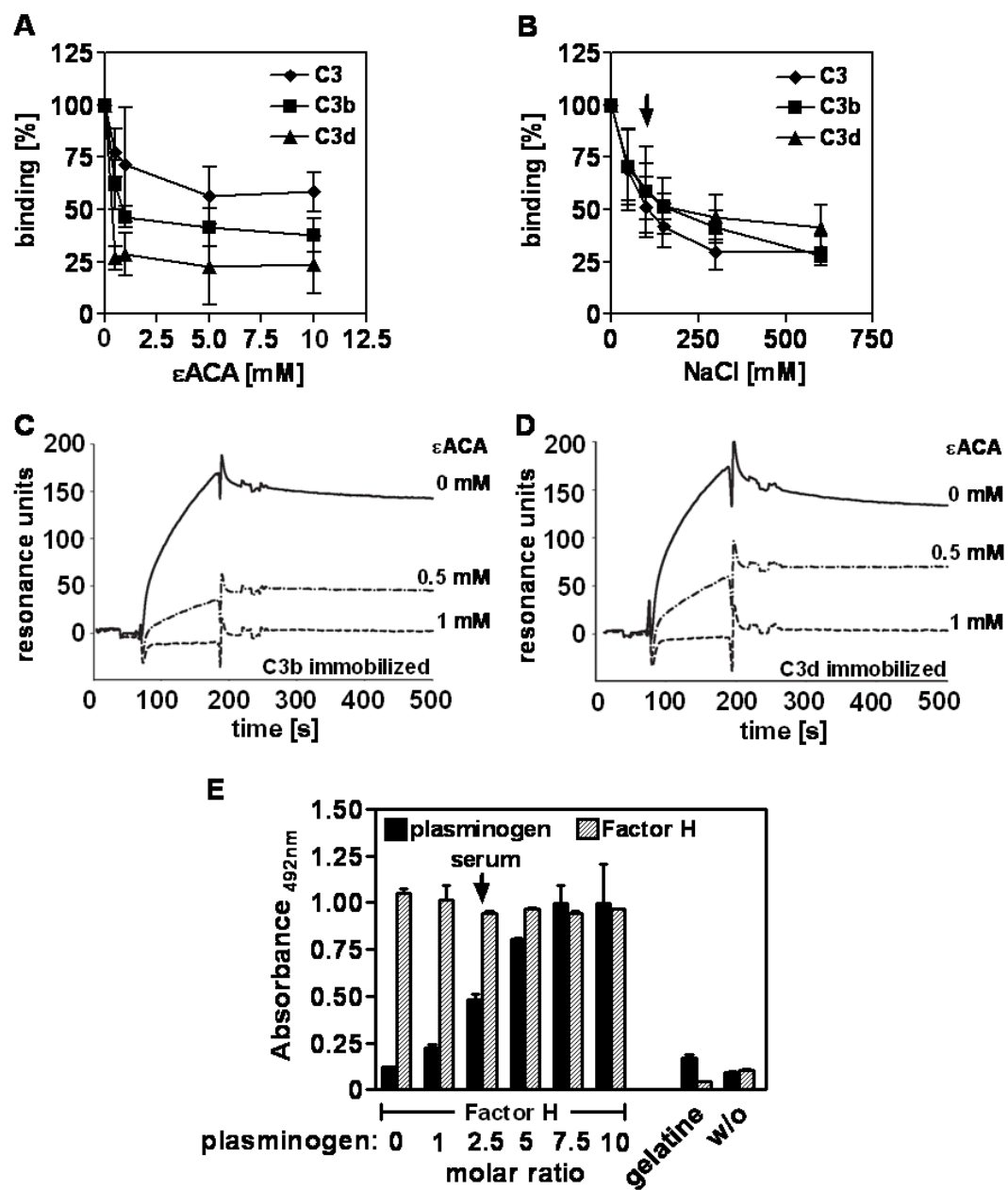
induced by H₂O and set 100 %. UPa treated plasminogen (◆) inhibited lysis of erythrocytes and the effect was dose dependent. When added at a physiological concentration plasmin(ogen) inhibited AP by 30 % (↓) and at 4 μM, plasmin inhibited AP by 80 %. Neither plasminogen (■) nor uPa (▲) when added alone showed a significant inhibitory effect. In the presence of aprotinin (●) plasmin mediated inhibition was blocked by about 100 %. **(B)** Plasmin inhibits both AP and CP mediated hemolysis. Plasminogen used at concentrations from 0.5 to 4 μM was activated by uPa, combined with NHS and then added sensitized sheep erythrocytes. Following incubation erythrocytes lysis of was recorded by measuring the optical density. Erythrocyte lyses by H₂O was set 100 %. Plasmin(ogen) at physiological level inhibited CP activation (■) by 40 % (↓) and at 4 μM by 60 % compare to the AP of about 30 and 80 % (◆). **(C)** The plasmin inhibitor α₂-AP inhibited plasmin activity on sensitized sheep erythrocytes and consequently resulted in enhanced lyses. Erythrocytes lysis induced by H₂O was set 100 %. The effect of α₂-AP was dose dependent in the range of 25-100 μg/ml (*columns 4-7*). The bars represent the mean values of three independent experiments ± S.D.

FIGURE 9: Plasmin inhibited C3a generation of. **(A)** The blocking effect of plasmin for complement activation in NHS was further assayed by following C3a generation. In this case complement was activated via the AP by addition of zymosan to NHS. Then plasmin(ogen) (5-10 μg), plasminogen (10 μg), uPa (0.2 μg), or Factor H (5 μg) were added. After incubation, samples were separated by SDS-PAGE, transferred to a membrane and C3a generation was analyzed. No C3a was generated in NHS in the absence of zymosan (*lane 1*). Zymosan activated the AP and C3a was generated (*lane 2*). UPa treated plasminogen inhibited C3a generation (*lanes 3 and 4*). Plasminogen used alone did not and uPa added alone had minor blocking effect on C3a generation (*lanes 5 and 6*), and Factor H inhibited C3a generation (*lane 7*). C3a was used as control (*lane 8*). **(B)** C3a generation was also followed by ELISA. NHS in the absence of zymosan lacked C3a (*column 1*). Activation of NHS with zymosan resulted in the generation of C3a (*black column 2*). Again plasmin used at 5 μg inhibited C3a generation (*white striped column 3*). Factor H also used at 5 μg inhibited C3a generation (*grey striped column 4*). Buffer represents antibody control (*column 5*) and C3a was used as positive control (*column 6*). The results are representative data of four independent experiments.

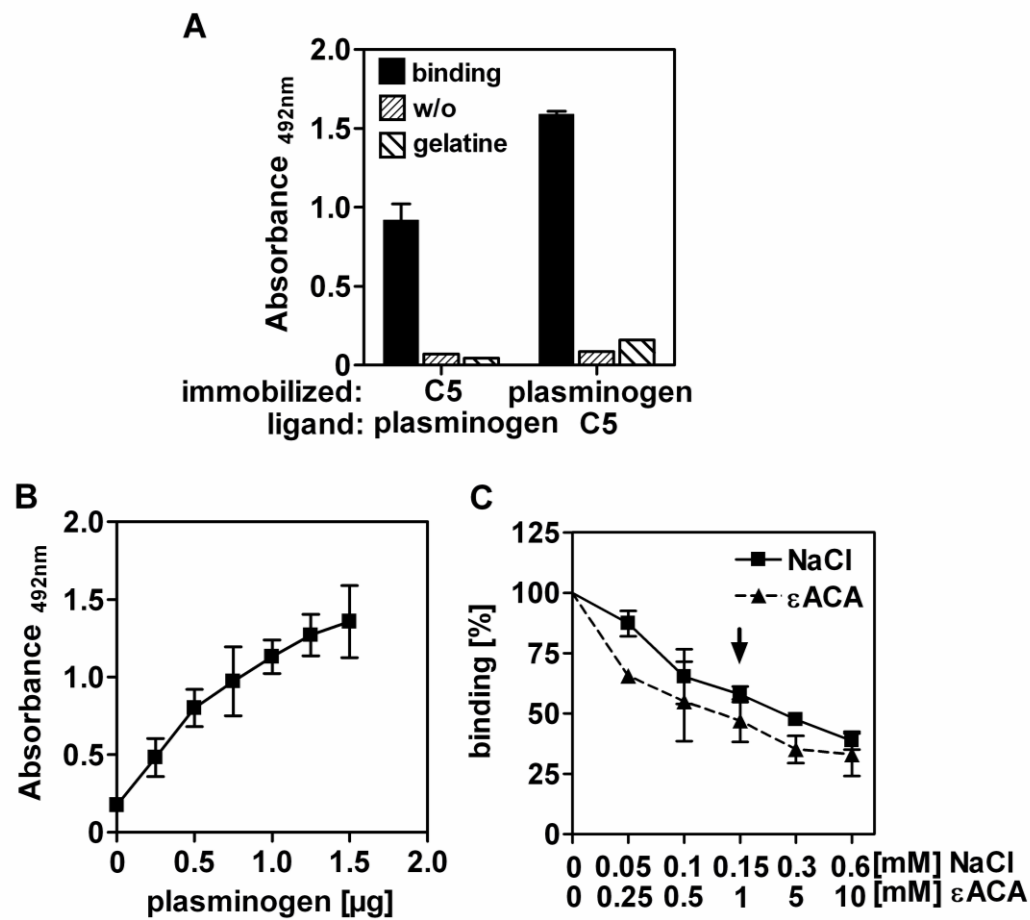
Barthel et al., Figure 1



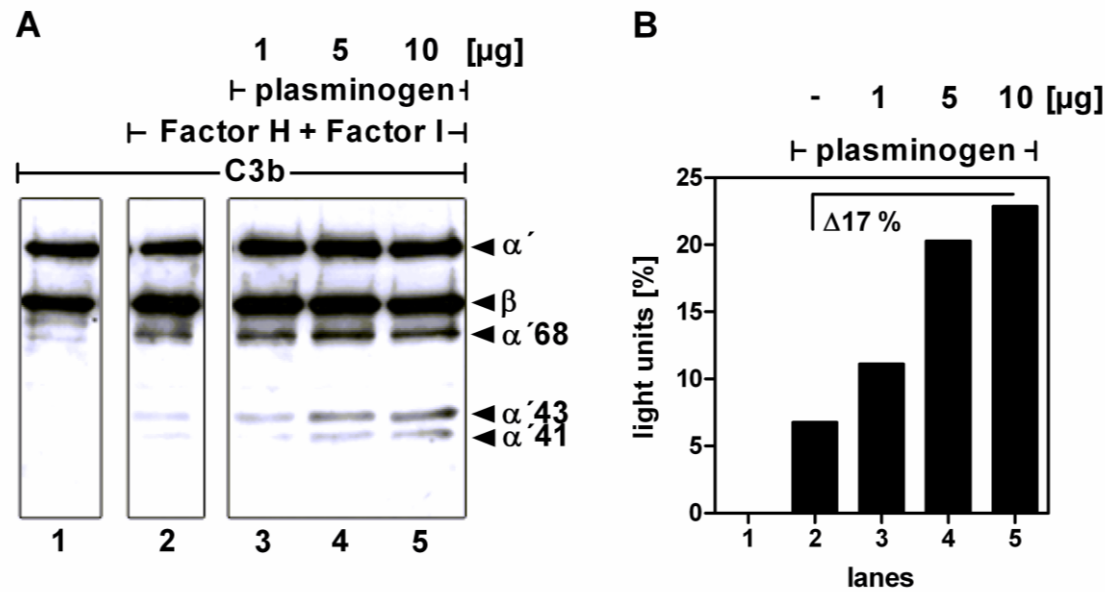
Barthel et al., Figure 2



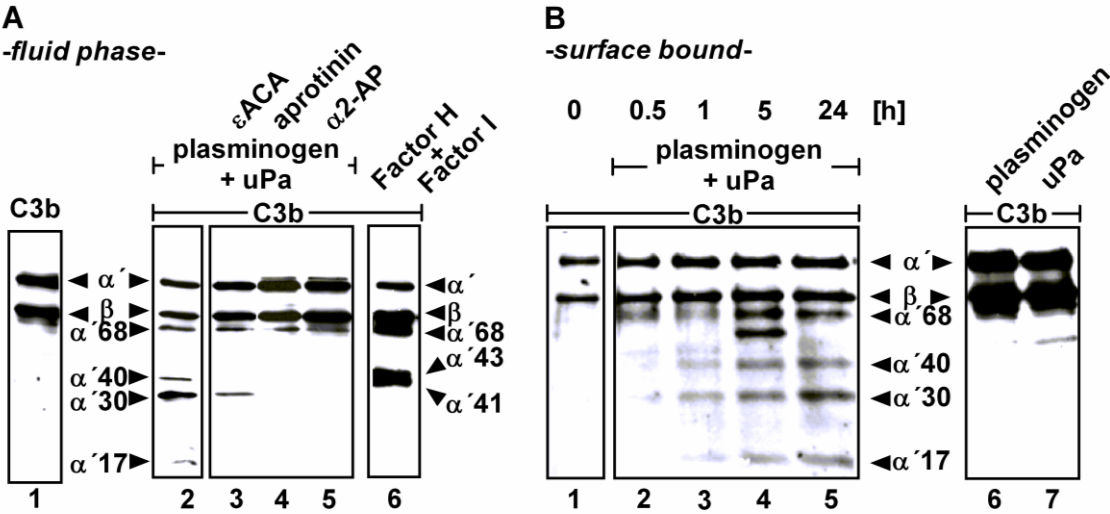
Barthel et al., Figure 3



Barthel et al., Figure 4

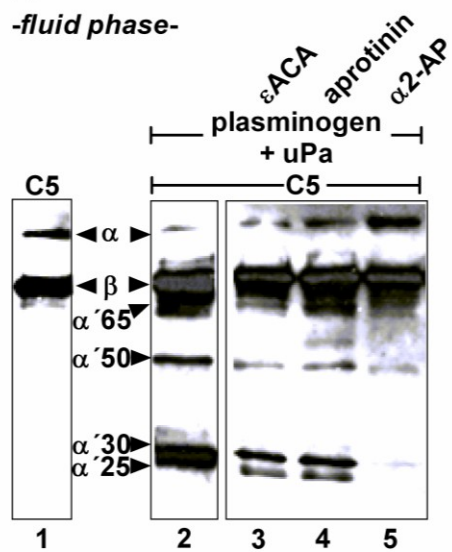


Barthel et al., Figure 5

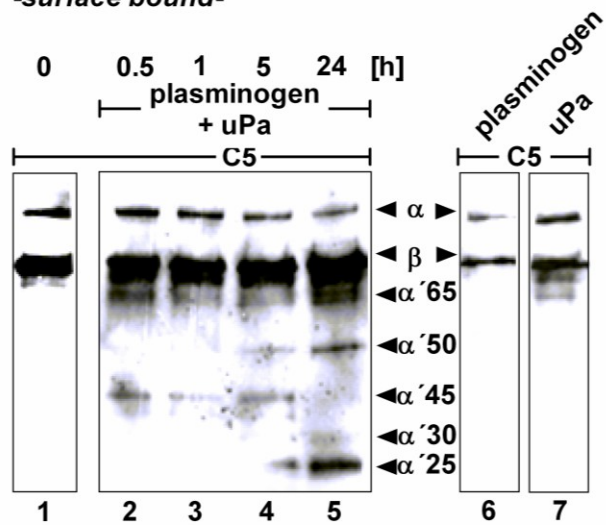


Barthel et al., Figure 6

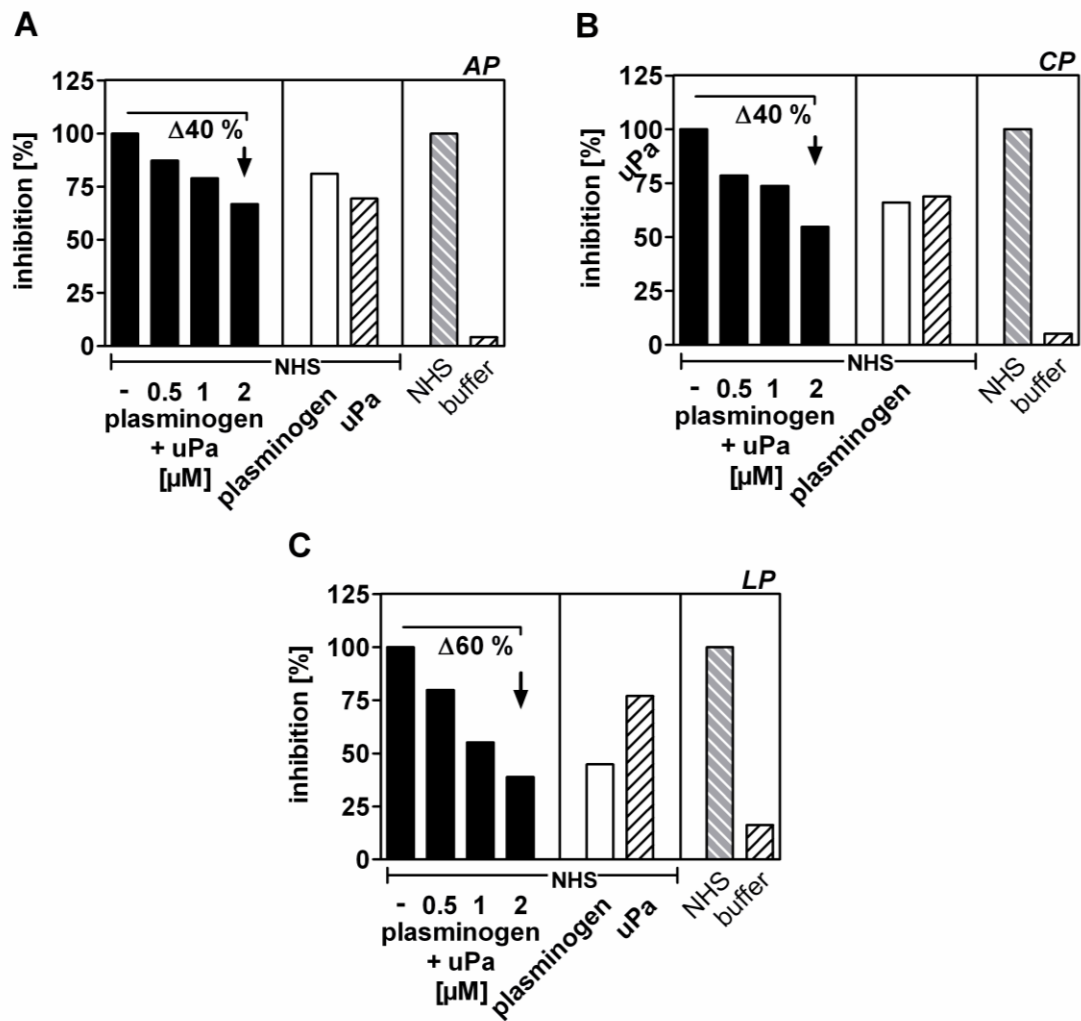
A

-fluid phase-

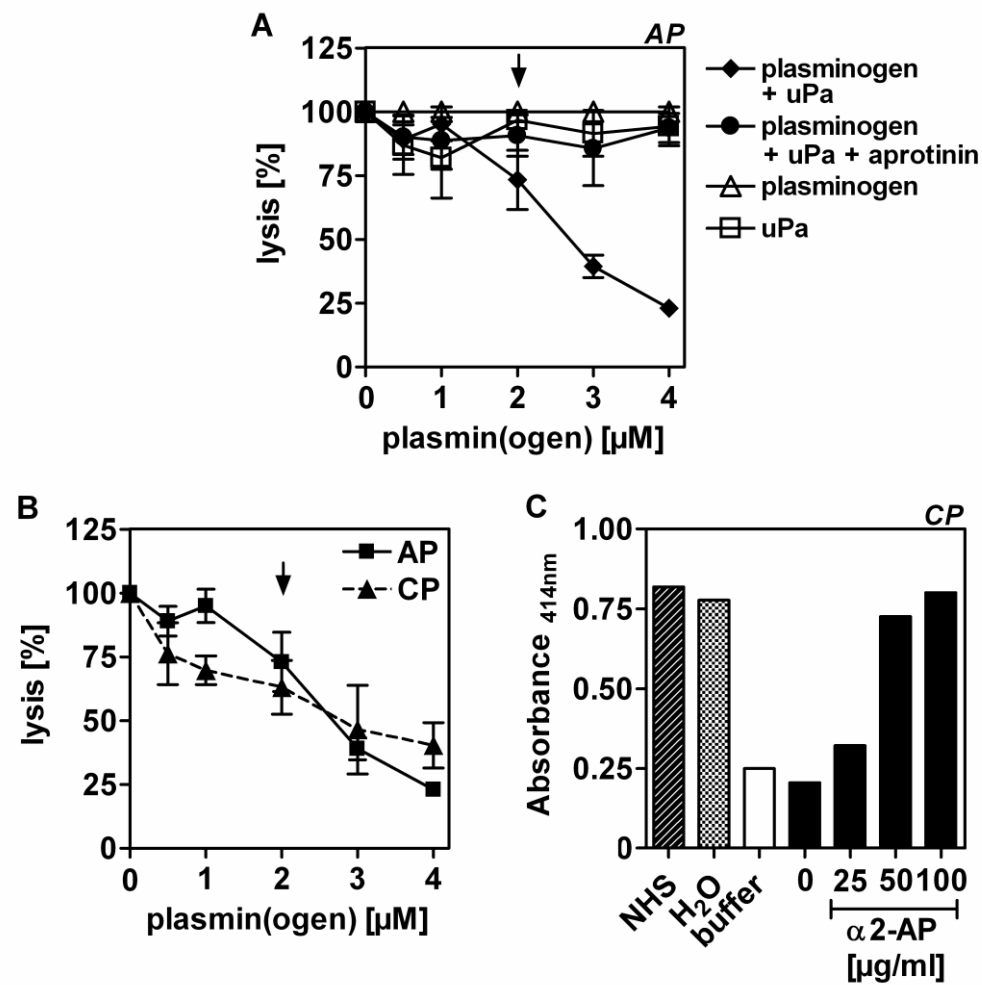
B

-surface bound-

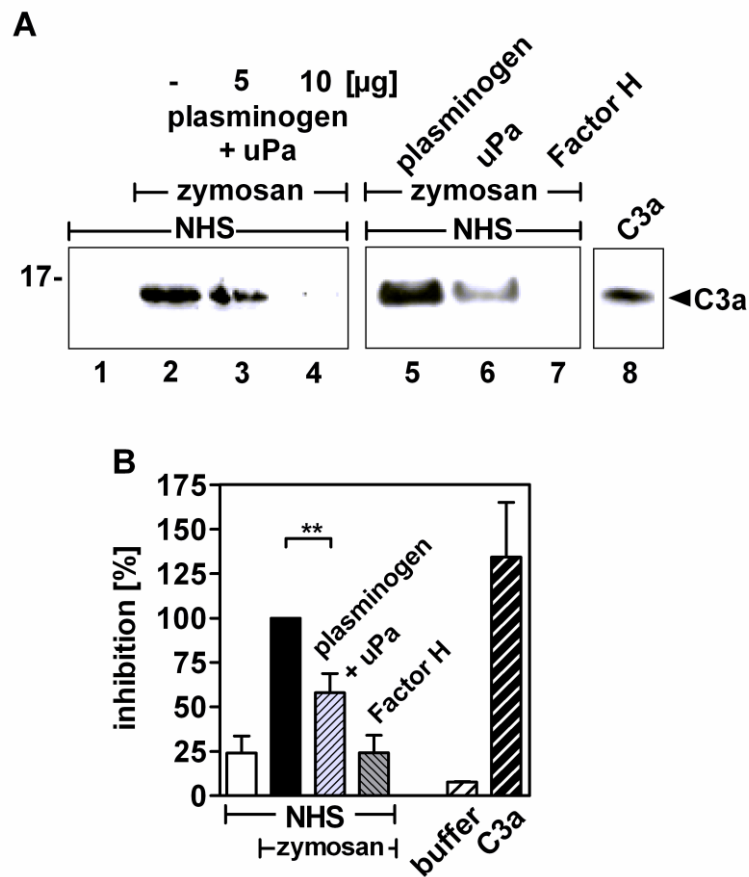
Barthel et al., Figure 7



Barthel et al., Figure 8



Barthel et al., Figure 9



5. Diskussion

Eine Infektion durch pathogene Mikroorganismen verläuft in vier klassischen Phasen: Etablierung, Adhäsion und Kolonisation, Invasion und Schädigung des Zielgewebes. Pathogene Mikroorganismen haben für diese Phasen verschiedene Strategien entwickelt, um den menschlichen Organismus schnell und erfolgreich zu infizieren. Dabei verfolgen sie die Strategien der Immunevasion und Gewebsinvasion und machen sich dabei menschliche Plasmaproteine zu Nutze. Die Rekrutierung von Plasminogen an die Oberfläche von Mikroorganismen scheint für Mikroorganismen ein verbreiteter Mechanismus zu sein. Viele pathogene Mikroorganismen binden Plasminogen aus dem menschlichen Serum und gebundenes Plasminogen wird daraufhin durch menschliche oder durch ihre eigenen exprimierten Plasminogenaktivatoren zur Serinprotease Plasmin aktiviert. Gebundenes Plasmin ist funktionell aktiv, spaltet und inaktiviert Komponenten des Komplementsystems und der EZM.

5.1. Charakterisierung von Plasminogen als Komplementregulator

In dem ersten Teil dieser Arbeit ist eine weitere Funktion des Plasmaproteins Plasminogen charakterisiert. Plasminogen, das Schlüsselenzym in der Fibrinolyse, spielt in weiteren Prozessen eine wichtige Rolle. Plasminogen, welches an Mikroorganismen gebunden und zur aktiven Protease konvertiert ist, erhält durch die Degradation von EZM-Proteinen eine wichtige Rolle in der Gewebsinvasion. Eine Interaktion von Plasminogen mit dem Komplementsystem geht aus Forschungsarbeiten aus den 50iger Jahren erstmals hervor. Diese Interaktion ist in den darauf folgenden Jahren nicht genauer untersucht worden und daher der Mechanismus bisher nicht im Detail verstanden.

In dieser Arbeit habe ich den Mechanismus von Oberflächen-gebundenem Plasminogen bei der Immunevasion pathogener Mikroorganismen genauer untersucht **[Manuskript 3]**. Plasminogen bindet die zentralen Komplementproteine C3 und C5. Die Bindung beider Proteine an Plasminogen erfolgt in Flüssigphase, aber auch an Oberflächen-gebundenem Plasminogen. Diese Eigenschaft verleiht den Mikroorganismen zwei Möglichkeiten mit dem Komplementsystem zu interagieren. Zu einem direkt auf der Oberfläche, sowie in unmittelbarer Umgebung des Mikroorganismus.

Plasminogen bindet zudem die C3-Aktivierungs Fragmente C3b, C3c und C3d, die durch die proteolytische Spaltung der Serinprotease Faktor I entstehen (**Abbildung 14**). Aus den Experimenten geht hervor, dass Plasminogen mit einer höheren Affinität an C3d bindet. Dies ist jedoch mit weiteren Analysen zu bestätigen. Das Anaphylatoxin C3a wird

nicht von Plasminogen gebunden. Wie die meisten Liganden von Plasminogen beruht die Bindung von C3 und der C3-Aktivierungsfragmenten C3b, C3c und C3d auf Lysinresten und basiert auf Ionenstärke.

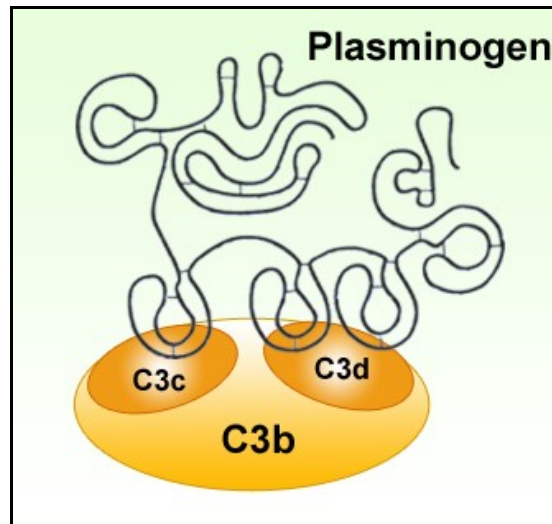


Abbildung 14: Plasminogen bindet an das Komplementprotein C3b.

Die Bindung von Plasminogen an C3b erfolgt über die C3b-Fragmente C3c und C3d. Plasminogen besitzt eine höhere Affinität zu C3d.

Der Komplementregulator des alternativen Weges Faktor H bindet ebenfalls C3b. Wie Plasminogen bindet Faktor H C3b über das C3d-Fragment und beide sind funktionell aktiv. Die Bindung der Plasmaproteine Plasminogen und Faktor H erfolgt somit simultan, so dass beide Plasmaproteine an unterschiedlichen Domänen des C3d-Fragmentes binden. Die beiden Plasmaproteine Plasminogen und Faktor H gehen ebenfalls einen Komplex miteinander ein. Plasminogen bindet Faktor H in den SCR-Einheiten 6-7 und 18-20 (*nicht veröffentlicht*). Faktor H besitzt eine Kofaktor-Aktivität für die Serinprotease Faktor I zur Inaktivierung von C3b. Diese Aktivität wird durch Plasminogen verstärkt und Plasminogen unterstützt somit die regulatorische Funktion von Faktor H.

Neben der unterstützenden Kofaktoraktivität für Faktor H besitzt die Serinprotease Plasmin eine eigene regulierende Funktion in der Komplementkaskade. Plasminogen, das zu Plasmin aktiviert ist, spaltet ebenso C3b und inaktiviert dessen Funktion als Opsonin und verhindert die Ausbildung der C3-Konvertase. Diese Aktivität ist in Flüssigphase sowie bei der Oberflächen-gebundenen Situation vorhanden. Das Spaltungsmuster von Plasmin unterscheidet sich jedoch von dem des Faktor I und es entstehen Plasmin-spezifische Fragmente. Faktor I spaltet die α -Kette des C3b in Fragmente mit einem Molekulargewicht von 68 und 43 kDa. Im späteren Verlauf wird das 68 kDa-Fragment in

zwei Fragmente mit einer Größe von 27 und 41 kDa gespalten. Plasmin spaltet ebenfalls die α -Kette von C3b und generiert Fragmente mit dem Molekulargewicht von 68, 40, 30 und 17 kDa und sind somit spezifisch für Plasmin (**Abbildung 15**). Der Plasminregulator α_2 -Antiplasmin und der Serinproteaseinhibitor Aprotinin inhibieren die Spaltung von C3b durch Plasmin und unterstreichen dessen Spezifität. Die Spaltung ist zudem zeitabhängig.

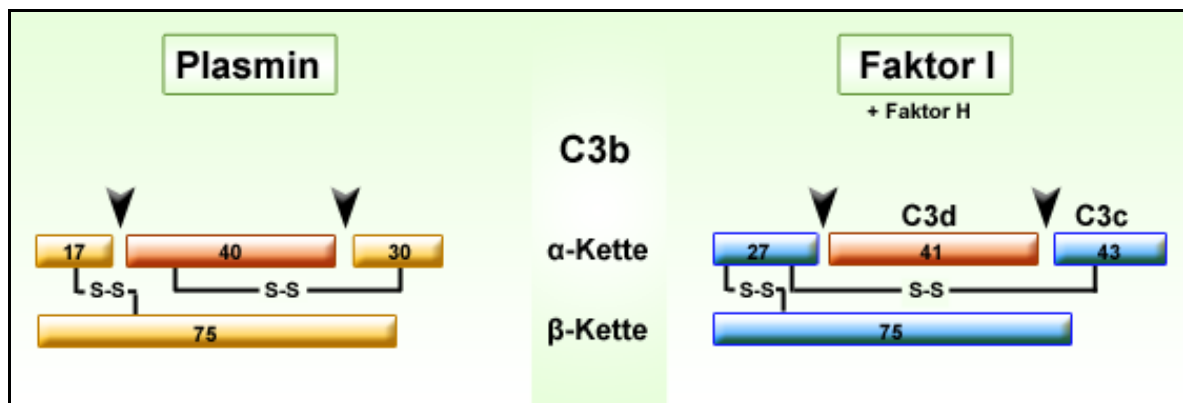


Abbildung 15: Die Serinproteasen Plasmin und Faktor I spalten C3b an unterschiedlichen Stellen.

Die Spaltung beider Serinproteasen erfolgt in einem unterschiedlichen Muster. Die schwarzen Pfeile illustrieren die Spaltungsstellen. In Rot sind die jeweiligen Bindungsregionen von Plasminogen und Faktor H markiert.

Plasminogen bindet neben C3b auch C5, das zweite zentrale Komplementprotein im Komplementsystem. Wie C3b bindet Plasminogen C5 in Flüssigphase und in Oberflächen-gebundenen Zustand und die Bindung beruht auf Lysinreste und Ionenstärke. Beim Ablauf des Komplementsystems spaltet die C5-Konvertase C5 in die Fragmente C5b und C5a. Das Fragment C5b besteht aus einer α - und einer β -Kette mit einer molekularen Größe von 105 und 75 kDa, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Die Spaltung von C5 durch Plasmin ist von der Spaltung durch die C5-Konvertase zu unterscheiden. Aktiviertes Plasminogen spaltet zunächst C5 in C5b und C5a. C5b wird jedoch wie C3b weiter gespalten in drei Fragmente mit einem Molekulargewicht von 50, 30 und 25 kDa (**Abbildung 16**). Auch hier ist die proteolytische Aktivität durch die Inhibitoren α_2 -Antiplasmin und Aprotinin vermindert und zeigt die Spezifität der Protease Plasmin.

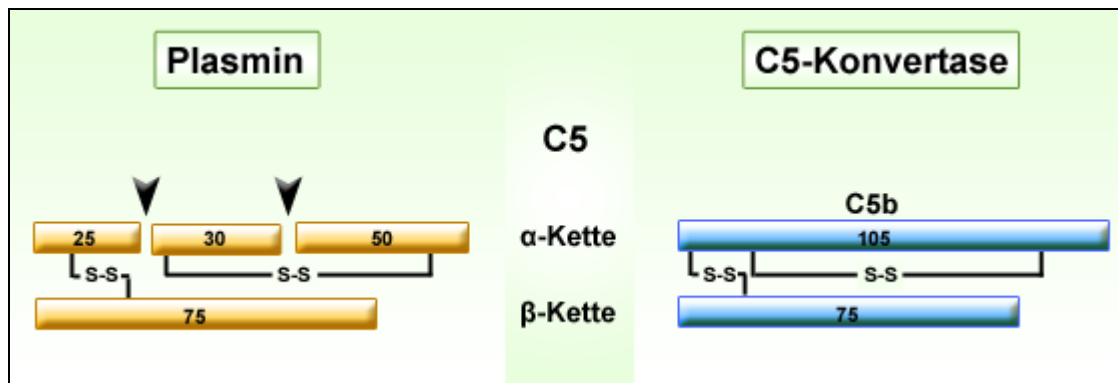


Abbildung 16: Die Serinprotease Plasmin und die C5-Konvertase spalten C5 an unterschiedlichen Stellen.

Plasmin und die C5-Konvertase spalten das Komplementprotein C5 auf unterschiedlicher Weise. Die schwarzen Pfeile illustrieren die Spaltungsstellen von Plasmin.

Für Plasminogen wird demnach eine neue Bedeutung als Komplementregulator übertragen. Zum einen ist Plasminogen als aktive Serinprotease Plasmin in der Lage die zentralen Komplementregulatoren C3b und C5 zu spalten und damit zu inaktivieren und zum anderen wird die proteolytische Aktivität von Faktor I zusammen mit dem Kofaktor Faktor H verstärkt.

Die Spaltung von C3b und C5 verleiht Plasmin(ogen) die Bedeutung als Komplementregulators und inhibiert die Komplementaktivierung aller drei Wege. Das zu Plasmin aktivierte Plasminogen inhibiert den alternativen sowie den klassischen Weg in Hämolyse-Assays. In beiden Experimenten wird mit Plasmin vorinkubiertes Serum zugeben. Folglich ist eine Inaktivierung des Komplementsystems zu beobachten. Plasmin spaltet die Komplementproteine C3b und C5, womit die Komplementkaskade unterbrochen wird und keine Lyse stattfindet.

Die Inhibierung des Komplementsystems durch Plasmin erfolgt somit an zwei unterschiedlichen Stellen und verleiht Plasminogen eine effiziente Rolle bei der Immunevasion von pathogenen Mikroorganismen. Für pathogene Mikroorganismen ist neben der Gewebsinvasion die Immunevasion essentiell für eine Infektion. Viele Mikroorganismen besitzen mehrere Strategien die erste Abwehrreaktion des menschlichen Organismus, das Komplementsystem, zu umgehen. Unter anderen binden sie Komplementregulatoren, die die Aktivierung der Komplementwege hemmen oder die Lyse der Zelle verhindern. Für die meisten bakteriellen Proteine, die Komplementregulatoren binden, ist ebenfalls eine Plasminogen-Bindung gezeigt. Die neue Bedeutung des Plasminogens als Komplementregulator verleiht den pathogenen Mikroorganismen die Eigenschaft, das gebundene Plasminogen zum einen für die

Gewebeinvasion zu nutzen, aber gleichzeitig auch das Komplementsystem an zwei verschiedenen Stellen zu regulieren.

Diese Arbeit charakterisiert Plasminogen als ein multifunktionelles Protein. Plasminogen interagiert mit den EZM-Proteinen wie Fibrin(ogen), Laminin sowie mit den Komplementproteinen C3, C3b und C5, die durch die aktive Form, dem Plasmin gespalten werden. Durch die Spaltung von C3 zu C3b durch Plasmin hat Plasmin(ogen) zunächst eine Funktion zur Aktivierung des Komplementsystems. Im weiteren Verlauf spaltet Plasmin C3b sowie C5 und inaktiviert dessen Funktion als Opsonin bzw. den Aufbau des Terminalen Komplexes. Demzufolge reguliert Plasmin das Komplementsystem auf zwei unterschiedlichen Wegen: (I) als Aktivator und (II) als Regulator (**Abbildung 18**).

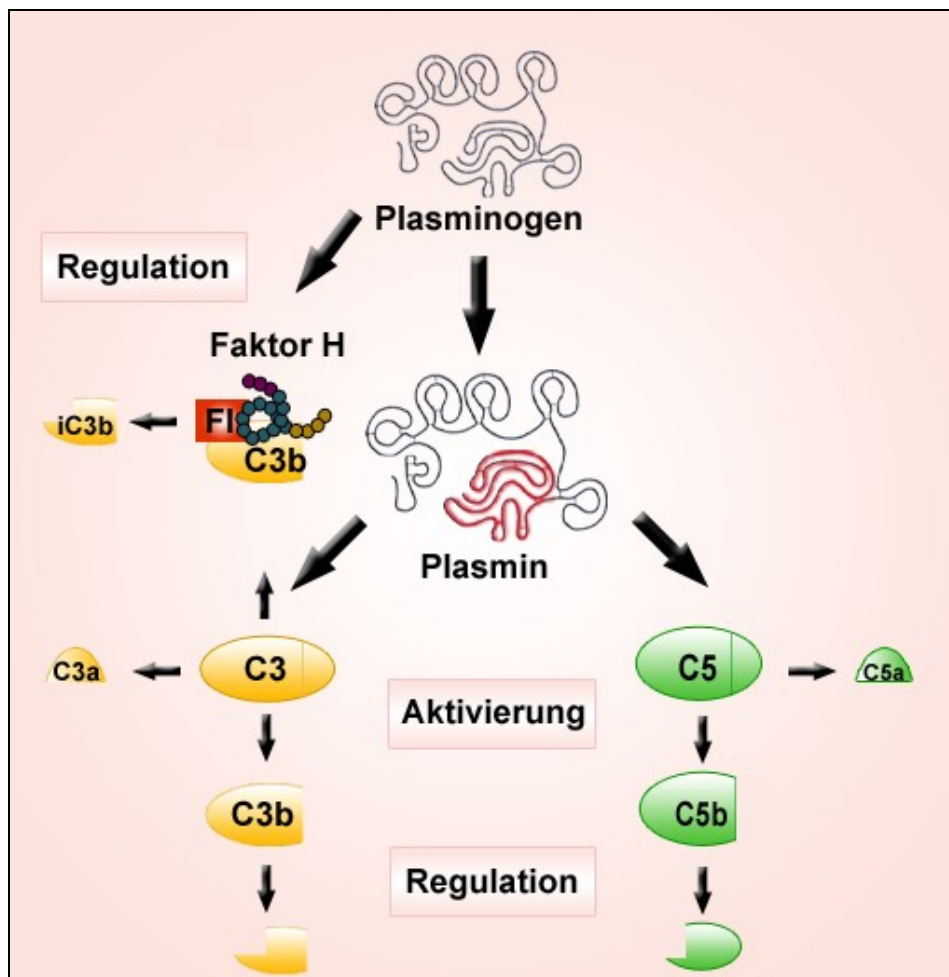


Abbildung 17: Die Rolle von Plasmin(ogen) im Komplementsystem.

Plasminogen unterstützt die Kofaktoraktivität von Faktor H und damit die C3b-Spaltung durch die Serinprotease Faktor I (FI). Plasminogen, das zur Serinprotease Plasmin aktiviert wurde, kann zum einen das Komplementsystem aktivieren und aktive C3a und C5a generieren und zum anderen das Komplementsystem regulieren, indem es C3b und C5 spaltet und damit inaktiviertes C3b und C5 generiert.

5.2. Gram-negative Bakterien nutzen Plasminogen zur Immunevasion

Der Mechanismus der Immunevasion von pathogenen Mikroorganismen ist noch nicht vollständig verstanden. Für die Gram-negativen Bakterien *Haemophilus influenzae* und *Borrelia burgdorferi* ist bekannt, dass sie Plasminogen an ihrer Oberfläche rekrutieren, jedoch sind die Plasminogen-Rezeptoren und die Funktion des gebundenen Plasminogens unbekannt. In dieser Arbeit habe ich eine neue Strategie der Gram-negativen Bakterien *H. influenzae* und *B. burgdorferi* bei der Immunevasion untersucht und charakterisiert. *H. influenzae* exprimiert das Adhäsionsprotein Protein E (PE) [Manuskript 1] und *B. burgdorferi* die „*complement regulator-acquiring surface proteins*“ (CRASP) -3, -4 und -5 [Manuskript 2], die das Plasmaprotein Plasminogen an ihrer Oberfläche binden und aktiviertes Plasmin zur Komplementevasion nutzen [Manuskript 3].

Bekannt ist die Rolle von Plasminogen bei der Gewebsinvasion. Das menschliche Plasmaprotein Plasminogen wird von mehreren Gram-negativen und Gram-positiven pathogenen Mikroorganismen genutzt, an die EZM über verschiedene EZM-Proteine wie Fibrin(ogen) und Laminin zu binden. Das gebundene Plasminogen wird anschließend zur aktiven Protease aktiviert und spaltet EZM-Proteine. Die Zellen verlieren ihren Schutz und die Mikroorganismen dringen in das Gewebe ein.

Zur Identifizierung des Plasminogen-bindenden Proteins von *H. influenzae* diente der nicht-typisierbare Laborstamm NTHi 3655. NTHi 3655 bindet Plasminogen und die Plasminogen-Bindung ist konzentrationsabhängig. Die Interaktion von Plasminogen und NTHi 3655 basiert auf Lysinreste und Ionenstärke. Dieses Muster ist bereits für mehrere Plasminogen-bindende Proteine bekannt, wie z.B. der Elongationsfaktor Tuf von *P. aeruginosa* und Pra1 von *C. albicans*. Die Rekrutierung von Plasminogen findet in allen Wachstumsphasen von *H. influenzae* statt, so dass das Plasminogen-bindende Protein kontinuierlich an der Oberfläche von *H. influenzae* exprimiert wird.

Das Protein PE von *H. influenzae* ist ein Adhäsionsprotein mit einer molekularen Größe von 16 kDa. PE bindet das Vitronektin ein EZM-Protein und Regulator des Terminalen Komplementweges. Die Bindung von Vitronektin verleiht *H. influenzae* Serumresistenz und somit eine effektive Strategie das Komplementsystem zu umgehen. In der Lunge induziert PE außerdem eine proinflammatorische Immunantwort [108, 134, 135]. Das Adhäsionsprotein PE spielt somit eine große Rolle bei der Pathogenität von *H. influenzae*. Es ist bekannt, dass bakterielle Proteine Komplementregulatoren und Plasminogen binden und damit die Effektivität dieses Virulenzfaktors erhöhen. Aus diesem Grund ist die Hypothese aufgestellt, dass PE ebenfalls ein Plasminogen-bindendes Protein ist.

Rekombinantes PE bindet Plasminogen konzentrationsabhängig, wobei die Bindung ebenfalls auf Lysinreste und Ionenstärke basiert. Die Verwendung einer PE *knock-out*-Mutante zeigte eine ca. 65% verringerte Bindung von Plasminogen im Vergleich zum Wildtyp. Die Bindung von Plasminogen und PE wurde zusätzlich mit einem *E. coli*-Stamm, der PE an der Oberfläche exprimiert, getestet und bestätigt. Auch hier ist eine vierfach verstärkte Bindung von Plasminogen an den PE exprimierten *E. coli*-Stamm im Vergleich zum Wildtyp zu beobachten. Die Bindung von nativen Plasminogen aus menschlichem Serum unterstreicht die Relevanz der Plasminogen-Bindung unter physiologischen Bedingungen. Diese Ergebnisse zeigen, dass PE ein Plasminogen-bindendes Protein ist und PE ist zudem als das Hauptbindeprotein charakterisiert. Neben PE ist die Aspartase als Plasminogen-bindendes Protein bekannt. Das erklärt, warum die *knock-out*-Mutante nur eine um 65 % verringerte Bindung zeigt.

Die Bindungsregion von Plasminogen befindet sich im N-Terminus des bakteriellen Proteins PE. Diese überlappt mit der Binderegion von Vitronektin und beide Plasmaproteine konkurrieren um die PE-Bindung. Jedoch ist eine gleichzeitige Bindung beider Proteine in physiologischen Konzentrationen zu beobachten. Die Bindung zweier Komplement-regulierenden Proteine verleiht PE eine Multifunktionalität und eine effektive Waffe zur Abwehr des Immunsystems.

Das an intakte Bakterien und an rekombinantes PE gebundene Plasminogen wird durch den menschlichen Aktivator uPa zu Plasmin aktiviert und ist funktionell aktiv. Die spezifische Umsetzung des synthetischen Substrates S-2251 durch Plasmin ist in beiden Fällen zu beobachten und ist konzentrationsabhängig. Eine Verminderte Substratumsetzung ist bei der PE *knock out*-Mutante zu sehen, dass aus der reduzierten Bindung begründet wird. Das gebundene Plasmin spaltet zusätzlich das Komplementprotein C3b und das EZM-Protein Fibrinogen und verleiht *H. influenzae* eine effektive Strategie zur Immunevasion und Gewebsinvasion.

Die CRASP-Proteine 3,4 und 5 (ErpP, ErpA und ErpC) von *B. burgdorferi* sind bereits für die Rekrutierung der Komplementregulatoren Faktor H und CFHR1 charakterisiert. Sie sind Mitglieder der Erp-Familie und werden in allen Phasen der Borrelien-Infektion exprimiert [35]. Diese drei Proteine sind mehr als 98 % identisch und besitzen eine molekulare Größe von 19-21 kDa.

Für die Plasminogen-Bindung sind fünf Erp-Proteinen untersucht worden. Die Proteine ErpA, ErpC und ErpP binden Plasminogen. Dagegen bindet Plasminogen nicht die Proteine ErpB und ErpQ. Aufgrund der hohen Ähnlichkeit wählte man ErpP (CRASP-3) als repräsentatives Protein zur Untersuchung der Plasminogen-Bindung. Plasminogen

bindet an ErpP konzentrationsabhängig und die Bindung basiert auf Lysinresten. Im Unterschied zu PE beruht die Bindung nicht auf Ionenstärke. Auch Heparin inhibierte nicht die ErpP-Plasminogen-Interaktion. Eine Abtrennung der C-Terminalen Lysinreste von ErpP bewirkt eine Verminderung der Plasminogen-Bindung, wodurch sich die Binderegion von Plasminogen im C-Terminus befindet. ErpP bindet außerdem Faktor H und die C-terminalen Lysine sind ebenfalls für die Faktor H-Bindung verantwortlich. Beide Plasmaproteine binden jedoch gleichzeitig und konkurrieren nicht um die ErpP-Bindung. Gebundenes Plasminogen ist zugänglich für Plasminogenaktivatoren, so dass Plasminogen zu aktiven Plasmin generiert. Plasmin ist funktionell aktiv und spaltet das synthetische Substrat S-2251.

Die Rekrutierung von Plasminogen durch pathogene Mikroorganismen zur Immunevasion und Gewebsinvasion ist eine weit verbreitete und allgemeine Strategie und verleiht den Erregern eine wichtige Virulenzeigenschaft. Viele pathogene Erreger binden Plasminogen an ihre Oberfläche, das durch menschliche oder durch ihre eigenen Plasminogenaktivatoren zu Plasmin aktiviert wird. Neben *H. influenzae* und *B. burgdorferi* binden weitere Gram-negativen Bakterien an ihrer Oberfläche Plasminogen. Dazu gehört z.B. *Pseudomonas aeruginosa* [34] und *Helicobacter pylori* [47, 48]. Aber auch Gram-positive Bakterien wie *Streptococcus pneumoniae* binden Plasminogen [29, 52], sowie die pathogenen Pilze wie *Candida albicans* und *Aspergillus fumigatus* [63]. Einige bakterielle Proteine besitzen mehrere Liganden und binden neben Plasminogen z.B. die Komplementregulatoren Faktor H, FHL-1, CFHR1, C4BP oder Vitronektin. Dazu gehören auch PE von *H. influenzae* und die untersuchten CRASP-Proteine von *B. burgdorferi*. PE bindet den Terminalen Komplementregulator Vitronektin [108] und die CRASP-Proteine 3-5, Faktor H und CFHR1.

Die Mikroorganismen binden Plasminogen an ihrer Oberfläche und nutzen dieses, um an menschliche Epithelzellen anzuheften indem sie an bakterielle Plasminogen-Bindeproteine exprimieren. Außerdem verleiht ihnen die Aktivierung des gebundenen Plasminogens zu Plasmin effektive proteolytische Aktivität auf der bakteriellen Oberfläche. Diese proteolytische Aktivität vermittelt zum einen die Spaltung von Komponenten der EZM und verleiht den Mikroorganismen die Möglichkeit zur Verbreitung des menschlichen Organismus. Für *H. influenzae* wurde die Bedeutung der Plasminogen-Bindung noch nicht umfassend untersucht. Dagegen ist für *B. burgdorferi* eine Wichtigkeit für die Verbreitung im Vektor, die Schildzecke und im menschlichen Organismus gezeigt worden [163]. Neben den schon bekannten Plasminogen-bindenden Proteinen von *H. influenzae* und *B. burgdorferi*, konnten vier neue Proteine identifiziert und die Plasminogen-Bindung charakterisiert werden. Die Proteine besitzen einige

Gemeinsamkeiten, wie in ihrer kleinen Größe von ca. 16-21 kDa und sie sind Bestandteil der äußeren Membran. Die identifizierten Proteine werden kontinuierlich exprimiert [133, 158] und stehen den Bakterien in allen Phasen der Infektion zur Verfügung, um Plasminogen zu binden. Die Interaktion von Plasminogen und seinen bekannten Liganden wird durch die Lysinbindestellen in den Kringeldomänen vermittelt [8], ebenso bei den identifizierten Proteinen. Für die Erp-Proteine konnten die Lysinbindestellen in den Kringeldomänen 1-3 für die Bindung identifiziert werden. Ein Unterschied besteht in der Bindungseigenschaft. Die Plasminogen-Bindung an PE beruht auf Ionenstärke, dagegen binden die untersuchten CRASP-Proteine Plasminogen aufgrund neutraler Aminosäuren und sind Konformationsabhängig.

Neben der Degradation von EZM-Proteinen und der Verbreitung, kommt Plasminogen einer anderen Bedeutung nach, der Immunevasion. Plasminogen, aktiviert zur Serinprotease Plasmin, spaltet die Komplementproteine C3b und C5. Somit inhibiert Plasmin den Ablauf der Komplementkaskade und inaktiviert zusätzlich C3b als Opsonin [Manuskript 3]. Auch Plasminogen, das an PE oder an CRASP-3, -4 und -5 gebunden ist, ist funktionell aktiv und spaltet das Opsonin C3b und verleiht den Bakterien eine effektive Strategie der Immunevasion (**Abbildung 18**). Zudem besitzt Plasmin eine weitere Möglichkeit das Immunsystem zu umgehen, indem es Antikörper spaltet und inaktiviert [26]. Einige der Plasminogen-bindenden Proteine, wie z.B. die Enolase von *Streptococcus sobrinus* haben durch die Erhöhung der IL-10 Produktion eine Immunsupremierende Bedeutung [164].

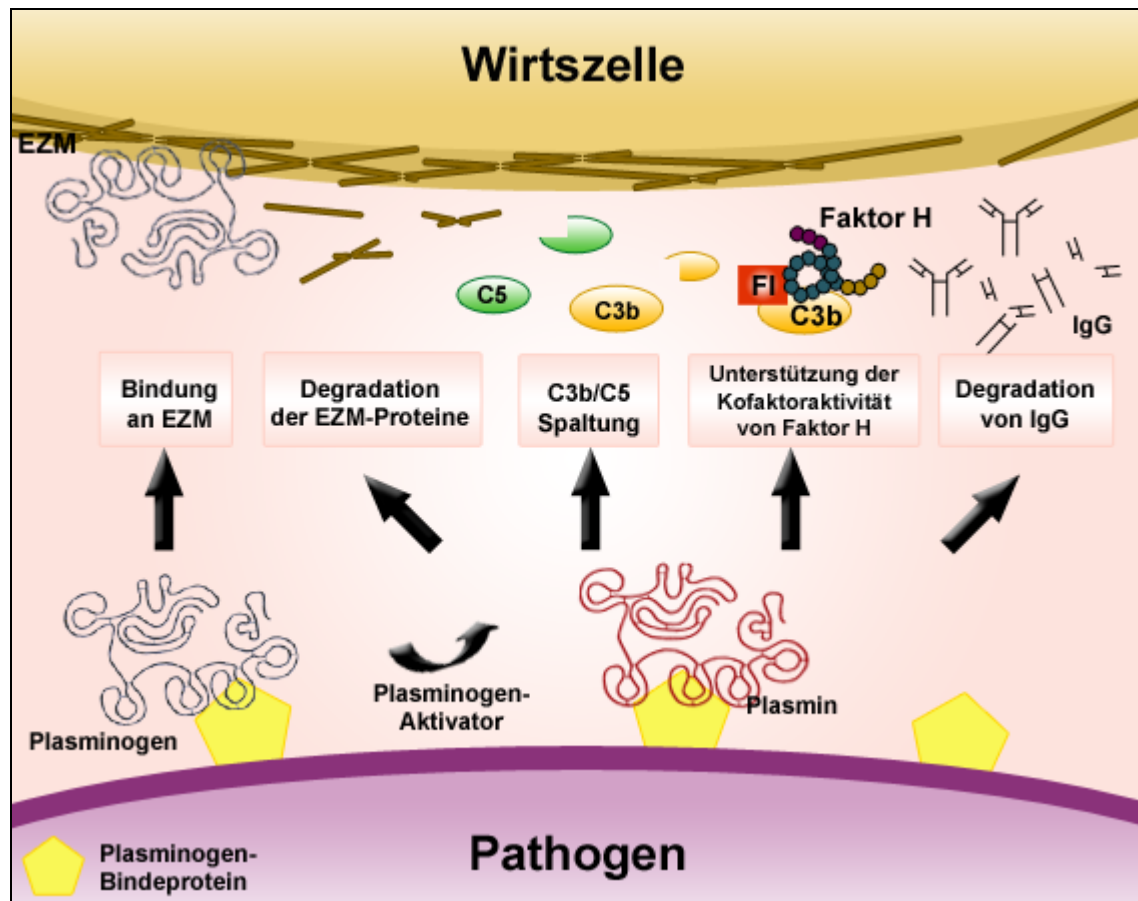


Abbildung 18: Die Rolle von Plasminogen bei der Immunevasion und Gewebsinvasion.

Pathogene Mikroorganismen exprimieren Proteine die Plasminogen an die Oberfläche rekrutieren. Gebundenes Plasminogen bindet an EZM-Proteine und vermittelt den Kontakt zwischen Pathogen und der Wirtszelle. Gebundenes Plasminogen wird außerdem durch menschliche oder mikrobielle Plasminogenaktivatoren zu Plasmin aktiviert und spaltet EZM-Proteine. Des Weiteren reguliert Plasmin das Immunsystem, indem es die Komplementproteine C3b und C5 spaltet und inaktiviert, die Kofaktoraktivität von Faktor H bei der Faktor I vermittelten C3b-Spaltung unterstützt und Antikörper spaltet und somit ebenfalls inaktiviert.

Für die untersuchten Proteine sind weitere Liganden bekannt [144, 156, 165]. Sie binden Komplementregulatoren, wie Faktor H, CFHR1 und Vitronectin und verleihen den Bakterien eine effektive Strategie der Immunevasion (**Tabelle 4**). Die Bindung von Plasminogen vermittelt diesen einen zusätzlichen Mechanismus zur Immunevasion. In beiden Fällen ist die Konkurrenz der Liganden bezüglich der Bindung untersucht. PE bindet Vitronectin und Plasminogen und beide Plasmaproteine konkurrieren um die Bindung an PE. In der physiologischen Plasmakonzentration ist jedoch eine Bindung beider Proteine möglich, somit besitzt PE die gleiche Affinität für beide Plasmaproteine. Für die CRASP-Proteine konnte ebenfalls keine Konkurrenz in der Bindung an Faktor H beobachtet werden. Folglich besitzen PE und die CRASP-Proteine die Eigenschaft ein großes Repertoire an Komplementregulatoren zu rekrutieren und somit eine effiziente Strategie zur Immunevasion.

Tabelle 4: Bakterielle Proteine binden mehrere verschiedene Plasmaproteine zur Immunevasion.

Spezies	Bakterielles Protein	Plasminogen	Faktor H	CFHR1	FHL-1	Vitronektin
<i>H. influenzae</i>	PE	+	?	?	?	+
<i>B. burgdorferi</i>	CRASP-3	+	+	+	-	?
	CRASP-4	+	+	+	-	?
	CRASP-5	+	+	+	-	?

„+“ – Bindung; „-“ – keine Bindung; „?“ – nicht getestet

6. Zusammenfassung

Der menschliche Organismus verfügt zur Erkennung und zur Abwehr von infektiösen Erregern über eine Reihe von hocheffizienten Abwehrmechanismen. Dabei übernehmen das Gerinnungs- und das Komplementsystem eine wichtige Rolle und repräsentieren eine der ersten Verteidigungslinie bei der Abwehr von infektiösen Erregern. Das Gerinnungssystem wird nach Eindringen eines Erregers bzw. nach einer Verletzung umgehend aktiviert und verhindert so die Ausbreitung des Erregers. Entsprechend hat das Komplementsystem eine weitere wichtige Rolle bei der Erkennung und Eliminierung von infektiösen Erregern.

Pathogene Mikroorganismen haben im Laufe der Evolution ein Repertoire an Virulenzfaktoren entwickelt und sind so in der Lage in einen immunkompetenten Wirt zu überleben und eine Infektion hervorzurufen. Die Bindung von Gerinnungskomponenten, wie Plasmin und Komplementregulatoren, wie Faktor H, FHL-1 und CFHR1 an die Oberfläche der Erreger ist eine effiziente Strategie der Immunevasion pathogener Mikroorganismen. In dieser Arbeit konnte ich eine weitere Strategie zur Evasion beschreiben und einen neuen Zusammenhang zwischen Gerinnungssystem und dem Komplement darstellen. Plasminogen ist das Schlüsselenzym der Fibrinolyse und wird von einer großen Anzahl von pathogenen Mikroorganismen an die Oberfläche gebunden. Das gebundene Plasminogen wird entweder durch menschliche oder durch bakterielle Plasminogenaktivatoren zur aktiven Protease Plasmin aktiviert. So kann das gebundene Plasmin die zentralen Komplementproteine C3b und C5 und ebenfalls Proteine der Extrazellulären Matrix binden und degradieren. Dadurch wird die Aktivierung des Komplementsystems unterbrochen und die stabile Struktur der EZM wird zerstört. Somit nutzen pathogenen Mikroorganismen Plasmin(ogen) als eine sehr effektive Waffe zur Immunevasion und Gewebsinvasion.

Wie ich in dieser Arbeit gezeigt habe, rekrutieren die beiden Gram-negativen Bakterien *Haemophilus influenzae* und *Borrelia burgdorferi* Plasminogen an ihrer Oberfläche und nutzen aktiviertes Plasmin Immunevasion. Das Protein Protein E (PE) von *H. influenzae* ist als das Hauptbindepotein für Plasminogen identifiziert worden. Dieses Adhäsionsprotein vermittelt als Oberflächenprotein die Akquirierung von Plasminogen. Gebundenes Plasminogen wird durch die Urokinase zu Plasmin aktiviert und spaltet die natürlichen Substrate, das Opsonin C3b und das EZM-Protein Fibrinogen. Diese Strategie konnte ich ebenfalls für den menschlichen pathogenen Mikroorganismus *B. burgdorferi* zeigen und die Proteine CRASP-3, -4 und -5 („complement regulator-acquiring surface proteins“) als Plasminogen-Bindende Proteine identifizieren.

Zusammenfassend nutzen die beiden Gram-negativen Bakterien *H. influenzae* und *B. burgdorferi* das menschliche Plasmaprotein Plasminogen zur Immunevasion. Beide pathogene Mikroorganismen exprimieren mehrere Plasminogen-Bindeproteine, welche die Bindung von Plasminogen an ihrer Oberfläche vermitteln. Plasminogen wird über die Kringeldomänen gebunden, damit bleibt die Proteasedomäne für die Aktivatoren zugänglich und das gebundene Plasminogen kann zur aktiven Protease Plasmin konvertiert werden. Plasmin inhibiert die Komplementaktivierung indem es die zentralen Komplementproteine C3b und C5 spaltet. Zusätzlich verhindert Plasmin durch die Spaltung von C3b die Opsonierung durch Makrophagen. Somit verhilft Plasminogen den beiden Gram-negativen Bakterien *H. influenzae* und *B. burgdorferi* zu einer effizienten Strategie der Immunevasion und Gewebsinvasion.

7. Summary

The human body develops to detect and to defend infectious pathogens a number of highly efficient defense mechanisms. The coagulation and the complement system have an important role and represent the first line of defense in the defense against infectious pathogens. The coagulation system is activated immediately after injury or penetration of pathogens and prevents the spread of infectious pathogens. The complement system plays also an important role in detection and elimination of infectious pathogens.

During the evolution pathogenic microorganisms have developed a repertoire of virulence factors to survive in a host and cause an infection. The binding of complement regulators like Factor H, FHL-1 and CFHR1 is an effective strategy for immune evasion of pathogenic microorganisms. In this work, I have shown a new strategy for complement evasion und described a new cross talk between coagulation and complement system. Plasminogen is the key enzyme of fibrinolysis and is bound by a large number of pathogenic microorganisms on their surface. Bound plasminogen is activated by human or bacterial plasminogen activators to the active protease plasmin. Plasminogen bound to microorganisms interacts with the central complement proteins C3b and C5 and with proteins of the extracellular matrix and cleaves them into inactive fragments. Thereby plasmin interrupts the complement system and destroys the stable structure of the extracellular matrix. Thus pathogenic microorganisms using plasmin(ogen) as a very effective weapon for immune evasion and tissue invasion.

I have shown that the two gram-negative bacteria *Haemophilus influenzae* and *Borrelia burgdorferi* recruit plasminogen to their surface and use active plasmin for immune evasion. The protein Protein E (PE) of *H. influenzae* is identified as the major plasminogen binding protein. This adhesion protein mediates as surface protein the acquisition of plasminogen on the surface of *H. influenzae*. Bound plasminogen is activated to plasmin by urokinase and cleaves the natural substrates the opsonin C3b and the extracellular matrix protein fibrinogen. This strategy, I could also show for the human pathogenic microorganism *Borrelia burgdorferi* and the proteins CRASP-3, -4 and -5 ("complement regulator-acquiring surface proteins") were identified as plasminogen-binding proteins.

In summary, both gram-negative bacteria *H. influenzae* and *B. burgdorferi* use the human plasma protein plasminogen for immune evasion. Both pathogenic microorganisms use more than one plasminogen binding proteins to acquire plasminogen in a large amount of their surface. Plasminogen is bound via the kringle domains, so that the protease domain is available for the activators and bound plasminogen is converted to the active protease

plasmin. Plasmin mediated the inhibition of the complement system by cleaving the central complement proteins C3b and C5. In addition, plasmin prevented opsonization of the macrophages by the cleavage of C3b. Thus the two gram-negative bacteria *H. influenzae* and *B. burgdorferi* use plasminogen as an efficient strategy of immune evasion and tissue invasion.

8. Literatur

1. Kluft, C., *The fibrinolytic system and thrombotic tendency*. Pathophysiol Haemost Thromb, 2003. **33**(5-6): p. 425-9.
2. Cesarman-Maus, G. and K.A. Hajjar, *Molecular mechanisms of fibrinolysis*. Br J Haematol, 2005. **129**(3): p. 307-21.
3. Raum, D., et al., Synthesis of human plasminogen by the liver. Science, 1980. **208**(4447): p. 1036-7.
4. Petersen, T.E., et al., Characterization of the gene for human plasminogen, a key proenzyme in the fibrinolytic system. J Biol Chem, 1990. **265**(11): p. 6104-11.
5. Burgin, J. and J. Schaller, Expression, isolation and characterization of a mutated human plasminogen kringle 3 with a functional lysine binding site. Cell Mol Life Sci, 1999. **55**(1): p. 135-41.
6. Saksela, O. and D.B. Rifkin, Cell-associated plasminogen activation: regulation and physiological functions. Annu Rev Cell Biol, 1988. **4**: p. 93-126.
7. Hoover-Plow, J., Does plasmin have anticoagulant activity? Vasc Health Risk Manag, 2010. **6**: p. 199-205.
8. Castellino, F.J. and S.G. McCance, The kringle domains of human plasminogen. Ciba Found Symp, 1997. **212**: p. 46-60; discussion 60-5.
9. Wu, H.L., et al., Interaction of plasminogen and fibrin in plasminogen activation. J Biol Chem, 1990. **265**(32): p. 19658-64.
10. Myohanen, H. and A. Vaheri, Regulation and interactions in the activation of cell-associated plasminogen. Cell Mol Life Sci, 2004. **61**(22): p. 2840-58.
11. Plow, E.F., et al., The cell biology of the plasminogen system. Faseb J, 1995. **9**(10): p. 939-45.
12. Baker, E.A., F.G. Bergin, and D.J. Leaper, Plasminogen activator system, vascular endothelial growth factor, and colorectal cancer progression. Mol Pathol, 2000. **53**(6): p. 307-12.

13. Harpel, P.C., R. Sullivan, and T.S. Chang, Binding and activation of plasminogen on immobilized immunoglobulin G. Identification of the plasmin-derived Fab as the plasminogen-binding fragment. *J Biol Chem*, 1989. **264**(1): p. 616-24.
14. Cao, Y., et al., Kringle domains of human angiostatin. Characterization of the anti-proliferative activity on endothelial cells. *J Biol Chem*, 1996. **271**(46): p. 29461-7.
15. Moroz, L.A., Mini-plasminogen: a mechanism for leukocyte modulation of plasminogen activation by urokinase. *Blood*, 1981. **58**(1): p. 97-104.
16. Andreasen, P.A., R. Egelund, and H.H. Petersen, *The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis*. *Cell Mol Life Sci*, 2000. **57**(1): p. 25-40.
17. Zorio, E., et al., *Fibrinolysis: the key to new pathogenetic mechanisms*. *Curr Med Chem*, 2008. **15**(9): p. 923-9.
18. Ullberg, M., G. Kronvall, and B. Wiman, *New receptor for human plasminogen on gram positive cocci*. *APMIS*, 1989. **97**(11): p. 996-1002.
19. Sun, H., The interaction between pathogens and the host coagulation system. *Physiology (Bethesda)*, 2006. **21**: p. 281-8.
20. Haiko, J., et al., The single substitution I259T, conserved in the plasminogen activator Pla of pandemic *Yersinia pestis* branches, enhances fibrinolytic activity. *J Bacteriol*, 2009. **191**(15): p. 4758-66.
21. Vranckx, L., et al., *Legionella pneumophila exhibits plasminogen activator activity*. *Microbiology*, 2007. **153**(Pt 11): p. 3757-65.
22. Ciambone, G.J. and P.J. McKeown-Longo, Plasminogen activator inhibitor type I stabilizes vitronectin-dependent adhesions in HT-1080 cells. *J Cell Biol*, 1990. **111**(5 Pt 1): p. 2183-95.
23. Vassalli, J.D., A.P. Sappino, and D. Belin, *The plasminogen activator/plasmin system*. *J Clin Invest*, 1991. **88**(4): p. 1067-72.
24. Wiman, B. and D. Collen, On the mechanism of the reaction between human alpha 2-antiplasmin and plasmin. *J Biol Chem*, 1979. **254**(18): p. 9291-7.
25. Lahteenmaki, K., P. Kuusela, and T.K. Korhonen, Plasminogen activation in degradation and penetration of extracellular matrices and basement membranes by invasive bacteria. *Methods*, 2000. **21**(2): p. 125-32.

26. Rooijakkers, S.H., et al., *Anti-opsonic properties of staphylokinase*. Microbes Infect, 2005. **7**(3): p. 476-84.
27. Rooijakkers, S.H., K.P. van Kessel, and J.A. van Strijp, *Staphylococcal innate immune evasion*. Trends Microbiol, 2005. **13**(12): p. 596-601.
28. Fulde, M., et al., SCM, a novel M-like protein from Streptococcus canis, binds (mini)-plasminogen with high affinity and facilitates bacterial transmigration. Biochem J, 2011. **434**(3): p. 523-35.
29. Bergmann, S., M. Rohde, and S. Hammerschmidt, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of Streptococcus pneumoniae is a surface-displayed plasminogen-binding protein. Infect Immun, 2004. **72**(4): p. 2416-9.
30. Pancholi, V. and V.A. Fischetti, A novel plasminogen/plasmin binding protein on the surface of group A streptococci. Adv Exp Med Biol, 1997. **418**: p. 597-9.
31. Esmon, C.T. and T. Mather, *Switching serine protease specificity*. Nat Struct Biol, 1998. **5**(11): p. 933-7.
32. Ullberg M, K.G., Karlsson I, Wiman B., *Receptors for human plasminogen on gram-negative bacteria*. Infect Immun, 1990. **58**(1): p. 21-25.
33. Sjostrom, I., et al., Purification and characterisation of a plasminogen-binding protein from Haemophilus influenzae. Sequence determination reveals identity with aspartase. Biochim Biophys Acta, 1997. **1324**(2): p. 182-90.
34. Kunert, A., et al., Immune evasion of the human pathogen Pseudomonas aeruginosa: elongation factor Tuf is a factor H and plasminogen binding protein. J Immunol, 2007. **179**(5): p. 2979-88.
35. Brissette, C.A., et al., Borrelia burgdorferi infection-associated surface proteins ErpP, ErpA, and ErpC bind human plasminogen. Infect Immun, 2009. **77**(1): p. 300-6.
36. Grosskinsky, S., et al., Borrelia recurrentis employs a novel multifunctional surface protein with anti-complement, anti-opsonic and invasive potential to escape innate immunity. PLoS ONE, 2009. **4**(3): p. e4858.
37. Verma, A., et al., Leptospiral endostatin-like protein A is a bacterial cell surface receptor for human plasminogen. Infect Immun, 2010. **78**(5): p. 2053-9.
38. Vieira, M.L., et al., Plasminogen acquisition and activation at the surface of leptospira species lead to fibronectin degradation. Infect Immun, 2009. **77**(9): p. 4092-101.

39. Jonsson, K., et al., Molecular cloning and characterization of two *Helicobacter pylori* genes coding for plasminogen-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(7): p. 1852-7.
40. Ljungh, A., *Helicobacter pylori* interactions with plasminogen. *Methods*, 2000. **21**(2): p. 151-7.
41. Kukkonen, M., et al., Identification of two laminin-binding fimbriae, the type 1 fimbria of *Salmonella enterica* serovar typhimurium and the G fimbria of *Escherichia coli*, as plasminogen receptors. *Infect Immun*, 1998. **66**(10): p. 4965-70.
42. Hu, L.T., et al., Isolation, cloning, and expression of a 70-kilodalton plasminogen binding protein of *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun*, 1997. **65**(12): p. 4989-95.
43. Fuchs, H., et al., The outer surface protein A of the spirochete *Borrelia burgdorferi* is a plasmin(ogen) receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(26): p. 12594-8.
44. Lagal, V., et al., *Borrelia burgdorferi* sensu stricto invasiveness is correlated with OspC-plasminogen affinity. *Microbes Infect*, 2006. **8**(3): p. 645-52.
45. Seling, A., et al., Functional characterization of *Borrelia spielmanii* outer surface proteins that interact with distinct members of the human factor H protein family and with plasminogen. *Infect Immun*, 2010. **78**(1): p. 39-48.
46. Lahteenmaki, K., et al., *Immobilization of plasminogen on Escherichia coli flagella*. *FEMS Microbiol Lett*, 1993. **106**(3): p. 309-14.
47. Pantzar, M., A. Ljungh, and T. Wadstrom, *Plasminogen binding and activation at the surface of Helicobacter pylori CCUG 17874*. *Infect Immun*, 1998. **66**(10): p. 4976-80.
48. Yarzabal, A., et al., A study of the interaction between *Helicobacter pylori* and components of the human fibrinolytic system. *Braz J Med Biol Res*, 2000. **33**(9): p. 1015-21.
49. Ullberg, M., et al., Binding of plasminogen to *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae* and formation of surface-associated plasmin. *J Infect Dis*, 1992. **166**(6): p. 1329-34.
50. Fox, D. and A.G. Smulian, Plasminogen-binding activity of enolase in the opportunistic pathogen *Pneumocystis carinii*. *Med Mycol*, 2001. **39**(6): p. 495-507.
51. Sako, T., et al., Cloning and expression of the staphylokinase gene of *Staphylococcus aureus* in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet*, 1983. **190**(2): p. 271-7.

52. Bergmann, S., et al., alpha-Enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. *Mol Microbiol*, 2001. **40**(6): p. 1273-87.
53. Attali, C., et al., *Streptococcus pneumoniae* choline-binding protein E interaction with plasminogen/plasmin stimulates migration across the extracellular matrix. *Infect Immun*, 2008. **76**(2): p. 466-76.
54. Papasergi, S., et al., Plasminogen- and fibronectin-binding protein B is involved in the adherence of *Streptococcus pneumoniae* to human epithelial cells. *J Biol Chem*, 2010. **285**(10): p. 7517-24.
55. Berge, A. and U. Sjöbring, *PAM, a novel plasminogen-binding protein from Streptococcus pyogenes*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(34): p. 25417-24.
56. Lottenberg, R., et al., Cloning, sequence analysis, and expression in *Escherichia coli* of a streptococcal plasmin receptor. *J Bacteriol*, 1992. **174**(16): p. 5204-10.
57. Li, Z., et al., Interaction between group A streptococci and the plasmin(ogen) system promotes virulence in a mouse skin infection model. *J Infect Dis*, 1999. **179**(4): p. 907-14.
58. Johnsen, L.B., et al., Purification and cloning of a streptokinase from *Streptococcus uberis*. *Infect Immun*, 1999. **67**(3): p. 1072-8.
59. Rosey, E.L., et al., *PauA: a novel plasminogen activator from Streptococcus uberis*. *FEMS Microbiol Lett*, 1999. **178**(1): p. 27-33.
60. Ward, P.N. and J.A. Leigh, Characterization of PauB, a novel broad-spectrum plasminogen activator from *Streptococcus uberis*. *J Bacteriol*, 2002. **184**(1): p. 119-25.
61. Lahteenmaki, K., et al., Expression of plasminogen activator pla of *Yersinia pestis* enhances bacterial attachment to the mammalian extracellular matrix. *Infect Immun*, 1998. **66**(12): p. 5755-62.
62. Crowe, J.D., et al., *Candida albicans* binds human plasminogen: identification of eight plasminogen-binding proteins. *Mol Microbiol*, 2003. **47**(6): p. 1637-51.
63. Behnsen, J., et al., The opportunistic human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* evades the host complement system. *Infect Immun*, 2008. **76**(2): p. 820-7.
64. Poltermann, S., et al., Gpm1p is a factor H-, FHL-1-, and plasminogen-binding surface protein of *Candida albicans*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(52): p. 37537-44.

-
65. Luo, S., et al., Immune evasion of the human pathogenic yeast *Candida albicans*: Pra1 is a Factor H, FHL-1 and plasminogen binding surface protein. *Mol Immunol*, 2009. **47**(2-3): p. 541-50.
 66. Rojas, M., et al., Characteristics of plasminogen binding to *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Acta Trop*, 2008. **107**(1): p. 54-8.
 67. Maldonado, J., et al., A study of cutaneous lesions caused by *Leishmania mexicana* in plasminogen-deficient mice. *Exp Mol Pathol*, 2006. **80**(3): p. 289-94.
 68. Boden, M.K. and J.I. Flock, Evidence for three different fibrinogen-binding proteins with unique properties from *Staphylococcus aureus* strain Newman. *Microb Pathog*, 1992. **12**(4): p. 289-98.
 69. Boden, M.K. and J.I. Flock, Cloning and characterization of a gene for a 19 kDa fibrinogen-binding protein from *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*, 1994. **12**(4): p. 599-606.
 70. Ringdahl, U. and U. Sjöbring, Analysis of plasminogen-binding M proteins of *Streptococcus pyogenes*. *Methods*, 2000. **21**(2): p. 143-50.
 71. Taylor, P.R., et al., Complement contributes to protective immunity against reinfection by *Plasmodium chabaudi chabaudi* parasites. *Infect Immun*, 2001. **69**(6): p. 3853-9.
 72. Medof, M.E., et al., Unique role of the complement receptor CR1 in the degradation of C3b associated with immune complexes. *J Exp Med*, 1982. **156**(6): p. 1739-54.
 73. Medof, M.E., G.M. Prince, and C. Mold, Release of soluble immune complexes from immune adherence receptors on human erythrocytes is mediated by C3b inactivator independently of Beta 1H and is accompanied by generation of C3c. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1982. **79**(16): p. 5047-51.
 74. Walport, M.J., *Complement. Second of two parts*. *N Engl J Med*, 2001. **344**(15): p.1140-4.
 75. Walport, M.J., *Complement. First of two parts*. *N Engl J Med*, 2001. **344**(14): p. 1058-66.
 76. Prodinger, W.M., Complement receptor type two (CR2,CR21): a target for influencing the humoral immune response and antigen-trapping. *Immunol Res*, 1999. **20**(3): p. 187-94.

77. Pangburn, M.K., R.D. Schreiber, and H.J. Muller-Eberhard, Formation of the initial C3 convertase of the alternative complement pathway. Acquisition of C3b-like activities by spontaneous hydrolysis of the putative thioester in native C3. *J Exp Med*, 1981. **154**(3): p. 856-67.
78. Zipfel, P.F., et al., Factor H and disease: a complement regulator affects vital body functions. *Mol Immunol*, 1999. **36**(4-5): p. 241-8.
79. Jozsi, M. and P.F. Zipfel, *Factor H family proteins and human diseases*. *Trends Immunol*, 2008. **29**(8): p. 380-7.
80. Zipfel, P.F., et al., *Factor H family proteins: on complement, microbes and human diseases*. *Biochem Soc Trans*, 2002. **30**(Pt 6): p. 971-8.
81. Zipfel, P.F. and C. Skerka, FHL-1/reconectin: a human complement and immune regulator with cell-adhesive function. *Immunol Today*, 1999. **20**(3): p. 135-40.
82. Heinen, S., et al., Factor H-related protein 1 (CFHR-1) inhibits complement C5 convertase activity and terminal complex formation. *Blood*, 2009. **114**(12): p. 2439-47.
83. Blom, A.M., B.O. Villoutreix, and B. Dahlback, *Functions of human complement inhibitor C4b-binding protein in relation to its structure*. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2004. **52**(2): p. 83-95.
84. Singh, B., Y.C. Su, and K. Riesbeck, Vitronectin in bacterial pathogenesis: a host protein used in complement escape and cellular invasion. *Mol Microbiol*, 2010. **78**(3): p. 545-60.
85. Schaiff, W.T. and P.R. Eisenberg, Direct induction of complement activation by pharmacologic activation of plasminogen. *Coron Artery Dis*, 1997. **8**(1): p. 9-18.
86. Patthy, L., *Evolution of blood coagulation and fibrinolysis*. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 1990. **1**(2): p. 153-66.
87. Huber-Lang, M., et al., Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. *Nat Med*, 2006. **12**(6): p. 682-7.
88. Davis, A.E., 3rd, *Biological effects of C1 inhibitor*. *Drug News Perspect*, 2004. **17**(7): p. 439-46.
89. Ratnoff, O.D. and G.B. Naff, *The conversion of C'IS to C'1 esterase by plasmin and trypsin*. *J Exp Med*, 1967. **125**(2): p. 337-58.
90. Pillemer, L., et al., *The inactivation of complement and its components by plasmin*. *J Exp Med*, 1953. **97**(4): p. 573-89.

91. Ward, P.A., A plasmin-split fragment of C'3 as a new chemotactic factor. J Exp Med, 1967. **126**(2): p. 189-206.
92. Wetsel, R.A. and W.P. Kolb, Expression of C5a-like biological activities by the fifth component of human complement (C5) upon limited digestion with noncomplement enzymes without release of polypeptide fragments. J Exp Med, 1983. **157**(6): p. 2029-48.
93. Wojta, J., K. Huber, and P. Valent, New aspects in thrombotic research: complement induced switch in mast cells from a profibrinolytic to a prothrombotic phenotype. Pathophysiol Haemost Thromb, 2003. **33**(5-6): p. 438-41.
94. Sundsmo, J.S. and D.S. Fair, *Relationships among the complement, kinin, coagulation, and fibrinolytic systems*. Springer Semin Immunopathol, 1983. **6**(2-3): p. 231-58.
95. Xue, W., et al., Physical association of complement receptor type 3 and urokinase-type plasminogen activator receptor in neutrophil membranes. J Immunol, 1994. **152**(9): p. 4630-40.
96. Amara, U., et al., *Interaction between the coagulation and complement system*. Adv Exp Med Biol, 2008. **632**: p. 71-9.
97. John G. Holt, P.H.S., *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams & Wilkin, 1986.
98. Eyler, J.M., *The state of science, microbiology, and vaccines circa 1918*. Public Health Rep, 2010. **125 Suppl 3**: p. 27-36.
99. Smith Wilson, A.C.H., Laidlaw P. P., *A Virus Obtained From Influenza Patients*. The Lancet, 1933. **222**: p. 66–68.
100. Kilian, M., *Haemophilus*. Manual of Clinial Microbiology, 2003: p. 623-635.
101. Holt John G., S.P.H., *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams & Wilkin, 1986.
102. Carlone, G.M., F.O. Sottnek, and B.D. Plikaytis, Comparison of outer membrane protein and biochemical profiles of Haemophilus aegyptius and Haemophilus influenzae biotype III. J Clin Microbiol, 1985. **22**(5): p. 708-13.
103. Mutters, R., Reidl, J, *Haemophilus*. J Lab Med 1998. **55**(1): p. 1 – 8.
104. Tristram, S., M.R. Jacobs, and P.C. Appelbaum, *Antimicrobial resistance in Haemophilus influenzae*. Clin Microbiol Rev, 2007. **20**(2): p. 368-89.

105. Hansen, E.J., et al., Immune enhancement of pulmonary clearance of nontypable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun*, 1988. **56**(1): p. 182-90.
106. Noel, G.J., S.K. Hoiseth, and P.J. Edelson, Type b capsule inhibits ingestion of *Haemophilus influenzae* by murine macrophages: studies with isogenic encapsulated and unencapsulated strains. *J Infect Dis*, 1992. **166**(1): p. 178-82.
107. Mulks, M.H., et al., Relationship between the specificity of IgA proteases and serotypes in *Haemophilus influenzae*. *J Infect Dis*, 1982. **146**(2): p. 266-74.
108. Hallstrom, T., et al., Nontypeable *Haemophilus influenzae* protein E binds vitronectin and is important for serum resistance. *J Immunol*, 2009. **183**(4): p. 2593-601.
109. Hallstrom, T. and K. Riesbeck, *Haemophilus influenzae and the complement system*. *Trends Microbiol*, 2010. **18**(6): p. 258-65.
110. Hallstrom, T., et al., *Haemophilus influenzae* interacts with the human complement inhibitor factor H. *J Immunol*, 2008. **181**(1): p. 537-45.
111. Barsum, W., et al., Interaction of fimbriated and nonfimbriated strains of unencapsulated *Haemophilus influenzae* with human respiratory tract mucus in vitro. *Eur Respir J*, 1995. **8**(5): p. 709-14.
112. Apicella, M.A., et al., Fimbriation of *Haemophilus* species isolated from the respiratory tract of adults. *J Infect Dis*, 1984. **150**(1): p. 40-3.
113. Hultgren, S.J., et al., Pilus and nonpilus bacterial adhesins: assembly and function in cell recognition. *Cell*, 1993. **73**(5): p. 887-901.
114. Henderson, I.R. and J.P. Nataro, *Virulence functions of autotransporter proteins*. *Infect Immun*, 2001. **69**(3): p. 1231-43.
115. Hallstrom, T., et al., *Haemophilus influenzae* surface fibrils contribute to serum resistance by interacting with vitronectin. *J Immunol*, 2006. **177**(1): p. 430-6.
116. Meng, G., et al., Structure of the outer membrane translocator domain of the *Haemophilus influenzae* Hia trimeric autotransporter. *EMBO J*, 2006. **25**(11): p. 2297-304.
117. St Geme, J.W., 3rd and D. Cutter, The *Haemophilus influenzae* Hia adhesin is an autotransporter protein that remains uncleaved at the C terminus and fully cell associated. *J Bacteriol*, 2000. **182**(21): p. 6005-13.

118. St Geme, J.W., 3rd, The HMW1 adhesin of nontypeable Haemophilus influenzae recognizes sialylated glycoprotein receptors on cultured human epithelial cells. Infect Immun, 1994. **62**(9): p. 3881-9.
119. Fink, D.L., B.A. Green, and J.W. St Geme, 3rd, The Haemophilus influenzae Hap autotransporter binds to fibronectin, laminin, and collagen IV. Infect Immun, 2002. **70**(9): p. 4902-7.
120. Risberg, A., E.K. Schweda, and P.E. Jansson, Structural studies of the cell-envelope oligosaccharide from the lipopolysaccharide of Haemophilus influenzae strain RM.118-28. Eur J Biochem, 1997. **243**(3): p. 701-7.
121. Roche, R.J. and E.R. Moxon, Phenotypic variation of carbohydrate surface antigens and the pathogenesis of Haemophilus influenzae infections. Trends Microbiol, 1995. **3**(8): p. 304-9.
122. Schachern, P.A., et al., Effect of lipooligosaccharide mutations of Haemophilus influenzae on the middle and inner ears. Int J Pediatr Otorhinolaryngol, 2009. **73**(12): p. 1757-60.
123. Schaar, V., et al., Multicomponent Moraxella catarrhalis outer membrane vesicles induce an inflammatory response and are internalized by human epithelial cells. Cell Microbiol, 2011. **13**(3): p. 432-49.
124. Schaar, V., et al., Moraxella catarrhalis outer membrane vesicles carry beta-lactamase and promote survival of Streptococcus pneumoniae and Haemophilus influenzae by inactivating amoxicillin. Antimicrob Agents Chemother, 2011. **55**(8): p. 3845-53.
125. Unal, C.M., V. Schaar, and K. Riesbeck, *Bacterial outer membrane vesicles in disease and preventive medicine*. Semin Immunopathol, 2011. **33**(5): p. 395-408.
126. Adams, W.G., et al., Decline of childhood Haemophilus influenzae type b (Hib) disease in the Hib vaccine era. JAMA, 1993. **269**(2): p. 221-6.
127. Forsgren, A., K. Riesbeck, and H. Janson, Protein D of Haemophilus influenzae: a protective nontypeable H. influenzae antigen and a carrier for pneumococcal conjugate vaccines. Clin Infect Dis, 2008. **46**(5): p. 726-31.
128. Bakaletz, L.O., et al., Protection against development of otitis media induced by nontypeable Haemophilus influenzae by both active and passive immunization in a chinchilla model of virus-bacterium superinfection. Infect Immun, 1999. **67**(6): p. 2746-62.

129. Prymula, R., et al., Pneumococcal capsular polysaccharides conjugated to protein D for prevention of acute otitis media caused by both *Streptococcus pneumoniae* and non-typable *Haemophilus influenzae*: a randomised double-blind efficacy study. *Lancet*, 2006. **367**(9512): p. 740-8.
130. Poolman, J.T., et al., *Developing a nontypeable Haemophilus influenzae (NTHi) vaccine*. *Vaccine*, 2000. **19 Suppl 1**: p. S108-15.
131. Akkoyunlu, M. and A. Forsgren, Local and systemic antibody levels against protein D of *Haemophilus influenzae* following immunization and infection in rats. *APMIS*, 1996. **104**(10): p. 709-17.
132. Neumeister B., W.K., *Medizinische Mikrobiologie*. mediscript-Verlag, 1997. **1**.
133. Ronander, E., et al., Identification of a novel *Haemophilus influenzae* protein important for adhesion to epithelial cells. *Microbes Infect*, 2008. **10**(1): p. 87-96.
134. Singh, B., et al., Protein E of *Haemophilus influenzae* is a ubiquitous highly conserved adhesin. *J Infect Dis*, 2010. **201**(3): p. 414-9.
135. Ronander, E., et al., Nontypeable *Haemophilus influenzae* adhesin protein E: characterization and biological activity. *J Infect Dis*, 2009. **199**(4): p. 522-31.
136. Kraiczy, P., et al., Growth inhibitory and bactericidal efficacy of sera from Lyme borreliosis patients on *B. burgdorferi* strains. *Wien Klin Wochenschr*, 1998. **110**(24): p. 886-93.
137. Burgdorfer, W., et al., *Lyme disease-a tick-borne spirochetosis?* *Science*, 1982. **216**(4552): p. 1317-9.
138. Girschick, H.J., H. Morbach, and D. Tappe, *Treatment of Lyme borreliosis*. *Arthritis Res Ther*, 2009. **11**(6): p. 258.
139. Steere, A.C., *Lyme disease*. *N Engl J Med*, 2001. **345**(2): p. 115-25.
140. Stewart, P.E., et al., The plasmids of *Borrelia burgdorferi*: essential genetic elements of a pathogen. *Plasmid*, 2005. **53**(1): p. 1-13.
141. Rupprecht, T.A., et al., The pathogenesis of lyme neuroborreliosis: from infection to inflammation. *Mol Med*, 2008. **14**(3-4): p. 205-12.
142. Kraiczy, P., et al., Further characterization of complement regulator-acquiring surface proteins of *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun*, 2001. **69**(12): p. 7800-9.
143. Kraiczy, P., et al., Mutational analyses of the BbCRASP-1 protein of *Borrelia burgdorferi* identify residues relevant for the architecture and binding of host

- complement regulators FHL-1 and factor H. *Int J Med Microbiol*, 2009. **299**(4): p. 255-68.
144. Hallstrom, T., et al., Complement regulator-acquiring surface protein 1 of *Borrelia burgdorferi* binds to human bone morphogenic protein 2, several extracellular matrix proteins, and plasminogen. *J Infect Dis*, 2010. **202**(3): p. 490-8.
145. Rossmann, E., et al., Dual binding specificity of a *Borrelia hermsii*-associated complement regulator-acquiring surface protein for factor H and plasminogen discloses a putative virulence factor of relapsing fever spirochetes. *J Immunol*, 2007. **178**(11): p. 7292-301.
146. McDowell, J.V., et al., Evidence that the variable regions of the central domain of VlsE are antigenic during infection with lyme disease spirochetes. *Infect Immun*, 2002. **70**(8): p. 4196-203.
147. Gilmore, R.D., Jr., et al., Outer surface protein C (OspC), but not P39, is a protective immunogen against a tick-transmitted *Borrelia burgdorferi* challenge: evidence for a conformational protective epitope in OspC. *Infect Immun*, 1996. **64**(6): p. 2234-9.
148. Gilmore, R.D., Jr., M.L. Mbow, and B. Stevenson, Analysis of *Borrelia burgdorferi* gene expression during life cycle phases of the tick vector *Ixodes scapularis*. *Microbes Infect*, 2001. **3**(10): p. 799-808.
149. Shi, Y., et al., Both decorin-binding proteins A and B are critical for the overall virulence of *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun*, 2008. **76**(3): p. 1239-46.
150. Lam, T.T., et al., Outer surface proteins E and F of *Borrelia burgdorferi*, the agent of Lyme disease. *Infect Immun*, 1994. **62**(1): p. 290-8.
151. Coleman, J.L., E.J. Roemer, and J.L. Benach, Plasmin-coated *Borrelia burgdorferi* degrades soluble and insoluble components of the mammalian extracellular matrix. *Infect Immun*, 1999. **67**(8): p. 3929-36.
152. Gebbia, J.A., J.L. Coleman, and J.L. Benach, *Borrelia* spirochetes upregulate release and activation of matrix metalloproteinase gelatinase B (MMP-9) and collagenase 1 (MMP-1) in human cells. *Infect Immun*, 2001. **69**(1): p. 456-62.
153. Hovius, J.W., A.P. van Dam, and E. Fikrig, *Tick-host-pathogen interactions in Lyme borreliosis*. *Trends Parasitol*, 2007. **23**(9): p. 434-8.
154. Nigrovic, L.E. and K.M. Thompson, *The Lyme vaccine: a cautionary tale*. *Epidemiol Infect*, 2007. **135**(1): p. 1-8.

155. Rossmann, E., et al., *Borrelia burgdorferi* complement regulator-acquiring surface protein 1 of the Lyme disease spirochetes is expressed in humans and induces antibody responses restricted to nondenatured structural determinants. *Infect Immun*, 2006. **74**(12): p. 7024-8.
156. Kraiczy, P., et al., Immunological characterization of the complement regulator factor H-binding CRASP and Erp proteins of *Borrelia burgdorferi*. *Int J Med Microbiol*, 2004. **293 Suppl 37**: p. 152-7.
157. Miller, J.C., et al., Temporal analysis of *Borrelia burgdorferi* Erp protein expression throughout the mammal-tick infectious cycle. *Infect Immun*, 2003. **71**(12): p. 6943-52.
158. Bykowski, T., et al., *Borrelia burgdorferi* complement regulator-acquiring surface proteins (BbCRASPs): Expression patterns during the mammal-tick infection cycle. *Int J Med Microbiol*, 2008. **298 Suppl 1**: p. 249-56.
159. Kraiczy, P., et al., Binding of human complement regulators FHL-1 and factor H to CRASP-1 orthologs of *Borrelia burgdorferi*. *Wien Klin Wochenschr*, 2006. **118**(21-22): p. 669-76.
160. Hefty, P.S., et al., OspE-related, OspF-related, and Elp lipoproteins are immunogenic in baboons experimentally infected with *Borrelia burgdorferi* and in human lyme disease patients. *J Clin Microbiol*, 2002. **40**(11): p. 4256-65.
161. Stevenson, B., et al., Differential binding of host complement inhibitor factor H by *Borrelia burgdorferi* Erp surface proteins: a possible mechanism underlying the expansive host range of Lyme disease spirochetes. *Infect Immun*, 2002. **70**(2): p. 491-7.
162. Kraiczy, P., et al., Immune evasion of *Borrelia burgdorferi*: mapping of a complement-inhibitor factor H-binding site of BbCRASP-3, a novel member of the Erp protein family. *Eur J Immunol*, 2003. **33**(3): p. 697-707.
163. Coleman, J.L., et al., Plasminogen is required for efficient dissemination of *B. burgdorferi* in ticks and for enhancement of spirochetemia in mice. *Cell*, 1997. **89**(7): p. 1111-9.
164. Veiga-Malta, I., et al., *Enolase from Streptococcus sobrinus is an immunosuppressive protein*. *Cell Microbiol*, 2004. **6**(1): p. 79-88.
165. Kraiczy, P., et al., Immune evasion of *Borrelia burgdorferi* by acquisition of human complement regulators FHL-1/reconnectin and Factor H. *Eur J Immunol*, 2001. **31**(6): p. 1674-84.

9. Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich,

- dass mir die gültige Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller Universität bekannt ist.
- dass die Promotionsarbeit von mir selbstständig angefertigt wurde. Alle Quellen und Hilfsmittel habe ich angegeben.
- dass alle Personen benannt wurden, die an der Auswahl, Erstellung und Auswertung der Manuskripte beteiligt waren.
- dass kein Promotionsberater in Anspruch genommen wurde und Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der Dissertation stehen.
- dass die vorgelegte Dissertation nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht wurde.
- dass weder die gleiche noch eine in wesentlichen Teilen ähnlichen oder eine andere Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht wurde.

Jena, 8. November 2011

Diana Barthel

10. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Diana Barthel
Geburtsdatum: 26.09.1983
Geburtsort: Leipzig
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig
Wohnort: Breslauer Str. 54, 04299 Leipzig
Telefon: 0178/2177429
Email: barthel.diana@gmx.de

Hochschulausbildung

- 08/2007 - 12/2011 Promotion am Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie, Jena in der Abteilung Infektionsbiologie unter der Leitung von Prof. Peter F. Zipfel
Thema der Promotion: „Die Rolle von Plasminogen bei der Immunevasion der Gram-negativen Bakterien *Haemophilus influenzae* und *Borrelia burgdorferi*“
- 10/2009 – 03/2010 Auslandsaufenthalt am Skåne Universitetssjukhus, Medical Microbiology, Malmö (Schweden) in Department of Laboratory Medicine unter der Leitung von Prof. Kristian Riesbeck
- 10/2004 – 05/2007 Studium der Biologie an der Julius-Maximilian Universität Würzburg mit Hauptfach Mikrobiologie und den Nebenfächern Genetik, Biochemie und Rechtsmedizin für Biologen
08/2006 – 05/2007 Diplomarbeit am Zentrum für Infektionsforschung unter der Betreuung von Prof. Jörg Hacker/ Dr. Gabriele Pradel
Thema der Diplomarbeit: „Charakterisierung der N⁺C⁻-gekoppelten Naphthylisochinolinalkaloide sowie Antibiotika in der Malariatherapie“
31.05.2007 Abschluss des Diploms mit der Gesamtnote „sehr gut“
- 10/2002 – 09/2004 Studium der Biologie an der Universität Leipzig
Abschluss des Vordiploms mit der Gesamtnote „gut“

Schul Ausbildung

09/2000 – 07/2002	Besuch des Max-Klinger-Gymnasiums in Leipzig Abschluss des Abiturs mit Note „gut“
09/1994 – 08/2000	Besuch des Nikolaus-Kopernikus-Gymnasiums in Leipzig
09/1990 – 08/1994	Besuch der 90. Grundschule in Leipzig

Jena, 8. November 2011

11. Übersicht von Vorträgen, Poster, Veröffentlichungen und Stipendien

11.1. Vorträge

1. X International Jena Symposium On Tick-Borne Diseases (IJSTD-X), Weimar
19. – 21. März 2009
The human plasma protein Plasminogen binds Complement regulator-acquiring surface protein 1 (CRASP-1) of *Borrelia burgdorferi*.
Diana Barthel, Peter F. Zipfel.
2. 3. Gemeinsame Tagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) und Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAV), Hannover
28 – 31. März 2010
Role of plasminogen during colonization of *Haemophilus influenzae*.
Diana Barthel, Peter F. Zipfel.
3. 63. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), Essen
25. – 28. September 2011
***Haemophilus influenzae* uses the PE Surface Protein to Acquire Human Plasminogen and to Evade Innate immunity.**
Diana Barthel, Peter F. Zipfel.

11.2. Poster

1. 4th National Infection Biology Meeting, Malmö, Schweden
13. – 14. November 2008
Binding of plasminogen to *Pseudomonas aeruginosa* proteins Lpd and Tuf.
Diana Barthel, Teresia Hallström, Josephine Losse, Katja Köhler and Peter F. Zipfel.
2. 4th Annual ILRS Symposium, Dornburg
07. – 08. März 2011
Plasminogen binds the adhesion protein PE of *Haemophilus influenzae*.
Diana Barthel, Birendra Singh, Kristian Riesbeck, Peter F. Zipfel.

3. 13th European Meeting on Complement, Leiden, Niederlande
21. – 24. August 2011
***Pseudomonas aeruginosa* Lipoamid dehydrogenase (LPD) binds multiple human plasma proteins for immune escape and facilitate tissue interaction.**
Teresia Hallström, Diana Barthel, Birendra Singh, Christine Skerka, Kristian Riesbeck, Peter F. Zipfel
4. 63. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), Essen
25. – 28. September 2011
The staphylococcal protein Efb binds plasminogen and enhances plasmin-mediated C3 degradation.
Tina Enghardt, Diana Barthel, Michael Reuter, Peter F. Zipfel, Christine Skerka

11.3. Veröffentlichungen

1. Brissette CA, Katrin Haupt, Diana Barthel, Cooley AE, Bowman A, Christine Skerka, Rainhard Wallich, Peter F. Zipfel, Peter Kraiczy, Brain Stevenson.
***Borrelia burgdorferi* infection-associated surface proteins ErpP, ErpA, and ErpC bind human plasminogen.** *Infect Immun.* (2009), 77(1): 300-6.
2. Diana Barthel, Birendra Singh, Kristian Riesbeck, Peter F. Zipfel.
***Haemophilus influenzae* uses the Protein E Surface Protein to Acquire Human Plasminogen and to Evade Innate Immunity.** *Akzeptiert in Journal of Immunology (Oktober 2011).*
3. Diana Barthel, Susan Schindler, Peter F. Zipfel.
Plasminogen Is a Potent Complement Inhibitor. *Eingereicht.*

11.4. Stipendien

1. DAAD-Doktorandenstipendium für die Forschungsarbeit in Malmö, Schweden
01. Oktober 2009 – 28. Februar 2010
Die Rolle von Plasminogen bei der Kolonisation von *Haemophilus influenzae*.
Diana Barthel

2. Reisestipendium DGHM/VAAM, Hannover

28. – 31. März 2010

Role of plasminogen during colonization of *Haemophilus influenzae*.

Diana Barthel

3. Reisestipendium DGHM, Essen

25. – 28. September 2011

***Haemophilus influenzae* uses the PE Surface Protein to Acquire Human Plasminogen and to Evade Innate immunity.**

Diana Barthel

12. Danksagung und Widmung

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Peter F. Zipfel für die Bereitstellung und die intensive Betreuung des sehr interessanten Promotionsthemas, für die wissenschaftlichen Diskussionen und die Zeit, die er sich stets genommen hat, um mich zu unterstützen.

Ich danke meinen Kollegen der Abteilung Infektionsbiologie, die mich während meiner Doktorandenzeit begleitet haben, für die freundschaftliche und familiäre Arbeitsatmosphäre. Hierbei danke ich vor allem den Laboren A019, A018 und A017, die mir das Arbeiten, sowie die Pausen sehr angenehm machten, die mich stets immer wieder motiviert haben und mit denen ich sehr viele schöne Erinnerungen teile. Ein ganz besonderer Dank gilt Tina Enghardt, die mir neben der Zeit als Doktorandin eine sehr gute Freundin geworden ist, für ihre kritischen Anregungen, die Hilfe im Labor und auch ihren humorvollen Umgang. Zudem verbinden mich mit meiner Doktorandenzeit viele Erlebnisse auch außerhalb des Labors, die mir das Leben in Jena sehr angenehm machten.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Freund Johannes Wolf, der mir immer den Rücken gestärkt hat und mich in allen Lebenslagen unterstützte. Ich bedanke mich bei meiner Familie und bei meinen Freunden, die mich seit vielen Jahren begleiten und mich zu dem gemacht haben, wo ich heute stehe.

Meine Doktorarbeit widme ich meiner kleinen Nichte Anna-Louise, die mit ihren jungen Jahren schon sehr viel durchleben musste und trotzdem immer ein Lächeln in mein Gesicht gezaubert hat.